

## 明 細 書

## 炎症性サイトカイン抑制剤

## 技術分野

[0001] 本発明は、抗CD61抗体を利用した炎症性サイトカイン抑制剤に関する。

## 背景技術

[0002] 炎症は、生物が刺激に応答して呈する複雑な一連の反応である。炎症の原因は様々であり、例えば、細菌やウイルス等の病原性微生物、外傷や放射線等の物理的因子、酸やアルカリなど化学的因子などの外因性因子によって引き起こされ、本来、炎症は生体の防御反応のひとつである。また、内因性の原因によって炎症が起こる場合もあり、例えば、内因性の自己抗原によって生じる免疫複合体は、自己免疫疾患を引き起こす。

[0003] 炎症症状を伴う疾患は非常に多いが、その一つとして敗血症が挙げられる。敗血症は、感染に対する全身性の炎症反応を呈する疾患であり、火傷、外傷、侵襲の大きい手術、癌や肺炎等の疾患に伴う感染が発症のきっかけとなることが多い。敗血症では、血液中の炎症性サイトカイン濃度の異常上昇が観察される(高サイトカイン血症)。重症例では、自己破壊的な全身性の炎症が発生し、血栓形成が生じ、短期間に複数の臓器が機能不全となり、最悪の場合は死に至る。

[0004] このような重篤な疾患にもかかわらず、敗血症の有効な治療法は多くはない。敗血症による死亡例は多く、米国では年間21万人が敗血症により死亡し、心臓疾患以外の集中治療室における死亡原因の最上位に位置づけられる。現在の临床上実用化された治療法としては、エンドトキシン吸着による血液浄化法や、医薬品では、抗凝固および抗炎症作用を持つ活性化プロテインC (Xigris<sup>TM</sup>, Eli Lilly and Company) の投与など、限られた治療が適用されているに過ぎない。

[0005] 炎症性サイトカインは、炎症促進に働くサイトカインである。サイトカインとは細胞間の情報伝達を担う多種多様な生理活性物質の総称であり、特異的受容体を介して細胞内シグナル伝達に関与することによって、様々な生体機能の制御に関与する物質群である。

[0006] サイトカインが関与する生体機能として、生体防御・免疫応答が挙げられる(非特許文献1)。中でも、本来生体防御反応である炎症は、サイトカインと深く関わりあっている。サイトカインのうち、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1、IL-12等は炎症促進に働くことから炎症性サイトカインとして分類される。また、これら炎症性サイトカインの産生を制御する活性をもつサイトカインは、抗炎症性サイトカインと呼ばれている(非特許文献2,3)。この炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインはお互いの産生量や活性を適宜調節していることが知られている(非特許文献3)。

[0007] IL-10は、抗炎症性サイトカインの一つである。IL-10による炎症性サイトカインTNF $\alpha$ やIFN $\gamma$ の産生抑制効果が期待されることから、乾癬患者やクローン病患者を対象として、IL-10を投与する臨床試験が実施されており、一定の成果が認められている(非特許文献8,9)。しかし、これら知見に反し、外因性IL-10の多量投与がかえって炎症を悪化させる恐れがあることも報告されており(非特許文献10)、IL-10による炎症性サイトカイン抑制効果を狙った炎症性疾患治療は容易ではない。

非特許文献1:宮島篤・北村俊雄・新井直子 サイトカインの分子生物学 羊土社  
1995

非特許文献2:Moore, K.W., et al., Annu. Rev. Immunol. 19:683-765, 2001

非特許文献3:Mosmann, T.R. Adv. Immunol., 56:1-26, 1994

非特許文献4:小安重夫 免疫学がわかる p74-80 羊土社 2000

非特許文献5:Mosmann, T.R. Ann. NY Acad. Sci., 664:89-92, 1992

非特許文献6:Bloom, B.R et al., Ann. Rev. Immunol., 10:453-488, 1997

非特許文献7:Klingemann, H.G and Dedhar, S., Blood 74(4):1348-1354, 1989

非特許文献8:Kimball, A.B., et al., Arch Dermatol 138(10):1341-1346, 2002

非特許文献9:Van Deventer, S.J.H., et al., Gastroenterology, 113: 383-389, 1997

非特許文献10:Lauw, F.N., et al., The Journal of immunology 2000, 165:2783-789

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明はこの様な状況に鑑みてなされたものであり、本発明が解決しようとする課題は、敗血症を含む炎症性疾患の新たな治療薬を提供することである。

## 課題を解決するための手段

- [0009] 上記課題を解決すべく、本発明者らは、炎症性疾患治療薬の候補物質を鋭意探索した。炎症性疾患とサイトカインの関係に注目した本発明者らは、内在的にサイトカインを制御する機能抗体を得ることを思いついた。ヒト末梢血単核球画分(PBMC)でマウスを免疫し、得られた抗体のサイトカイン制御効果について検討したところ、そのうちの一つである#33抗体がIFN $\gamma$ 産生を著しく抑制することを確認した。同時に、本発明者らは#33抗体のIL-10産生促進効果を確認した。
- [0010] 上述のとおり、外因性IL-10投与による予想に反する結果が報告されていることから、本発明者らは#33抗体のIL-10産生促進効果について、さらに検討した。その結果、#33抗体はIL-10産生を早める効果はあるが、過剰なIL-10産生を誘導する活性はないことがわかった。
- [0011] また、#33抗体による他のサイトカインの制御効果について検討したところ、多くの代表的炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。
- [0012] 上記結果から、本発明者らによる#33抗体は、過剰IL-10産生による炎症誘導の恐れがない一方、代表的炎症性サイトカインの産生を確実に抑制することが示された。#33抗体は、炎症性疾患治療に応用されれば、確実な有効性と高い安全性を兼ね備えた医薬品になり得る。さらにこの有望な抗体の抗原を調べたところ、抗原はCD61であることがわかった。すなわち、本発明者らは、CD61と結合する物質が炎症性サイトカイン産生抑制効果を有することを見出し、これによる炎症性疾患の新規治療薬を作出した。本発明は、具体的には以下のとおりである。
- (1) CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する物質またはその誘導体、
  - (2) 物質がタンパク質である、上記(1)に記載の物質またはその誘導体、
  - (3) 物質が抗体である、上記(1)に記載の物質またはその誘導体、
  - (4) 炎症性サイトカインがIFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1、IL-6のいずれかである上記(1)、上記(2)、または上記(3)に記載の物質またはその誘導体、
  - (5) IL-10産生誘導効果を有する、上記(1)、上記(2)、上記(3)、または上記(4)に記載の物質またはその誘導体、

- (6) 上記(1)から上記(5)のいずれかに記載の物質またはその誘導体を有効成分とする、炎症性サイトカイン産生抑制剤、
- (7) 下記(a)から(d)に記載の単離されたDNA
- (a) 配列番号9から配列番号16のいずれかに記載のDNA
- (b) 配列番号1から配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNA
- (c) 配列番号9から配列番号16のいずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA
- (d) 配列番号1から配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入、および／または置換されたアミノ酸配列をコードするDNA
- 、
- (8) 上記(7)に記載のDNAを保持するベクター、
- (9) 上記(7)に記載のDNAまたは上記(8)に記載のベクターを保持する形質転換体
- 、
- (10) 重鎖ポリペプチドが下記(a)または(b)のいずれかに記載のポリペプチドである、抗CD61抗体
- (a) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド
- (b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列番号4に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、
- (11) 下記(a)または(b)のいずれかに記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体
- (a) 配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列
- (b) 配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR(complementary determining region)として機能するアミノ酸配列、
- (12) 軽鎖ポリペプチドが下記(a)または(b)のいずれかに記載のポリペプチドである、抗CD61抗体

(a) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列番号8に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、

(13) 下記(a)または(b)のいずれかに記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体、

(a) 配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR(complementary determining region)として機能するアミノ酸配列、

(14) 上記(6)に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤、または、上記(10)から上記(13)のいずれかに記載の抗CD61抗体を含む、炎症性疾患の予防または治療用医薬品、

(15) 上記(6)に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤、または、上記(10)から上記(13)のいずれかに記載の抗CD61抗体を含む、高サイトカイン血症の予防または治療用医薬品、

(16) 上記(1)から上記(5)のいずれかに記載の物質またはその誘導体、または、上記(10)から上記(13)のいずれかに記載の抗CD61抗体を用い、炎症性サイトカインの産生を抑制する方法、

(17) 検体を抗CD61抗体と接触させる工程を含む、炎症性疾患治療または高サイトカイン血症治療における上記(14)または上記(15)に記載の医薬品の有効性を判定する方法、

(18) 炎症性疾患治療または高サイトカイン血症治療における上記(14)または上記(15)に記載の医薬品の有効性を判定するためのキット、

(19) 下記(a)から(b)記載の工程を含む、CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する物質をスクリーニングする方法

(a) CD61発現細胞にサイトカイン産生誘導剤および被験物質を接触させる工程

(b)炎症性サイトカインの量を測定し、サイトカイン産生誘導剤のみを接触させた対照と比較して、サイトカイン産生量を低下させた被験物質を選択する工程。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]#33抗体の炎症性サイトカイン産生抑制効果の経時的経過を示す図である。横軸は、抗体と刺激物(pl:C)添加後の時間、縦軸は各サイトカイン量を表す。

[図2]#33抗体の炎症性サイトカイン産生抑制効果を示す図である。

[図3]#33抗体によるIL-10産生誘導効果を示す図である。横軸は、抗体と刺激物(pl:C)添加後の時間、縦軸はIL-10量を表す。

[図4]A)IL-10によるIFN $\gamma$ 産生抑制効果について、サイトカイン産生誘導時からの経時的変化を示す図である。時間は、サイトカイン産生誘導からIL-10添加までの時間を示す。B)#33抗体によるIFN $\gamma$ 産生抑制にIL-10が関与していることを示す図である。括弧内の数字は、#33抗体濃度またはIL-10中和抗体濃度(ng/ml)を示す。

[図5]サイトカイン産生誘導時から#33抗体添加までの時間を変化させたときの、#33抗体による各種炎症性サイトカイン産生抑制効果を、サイトカイン産生誘導から48時間後に測定した結果を示す図である。時間は、サイトカイン産生誘導から#33抗体添加までの時間を示す。

[図6]A)ヒト単球様細胞THP-1を光学顕微鏡で観察した結果を示す図である。

B)THP-1をホルボールエステル(PMA)で活性化マクロファージ様に分化させた細胞を光学顕微鏡で観察した結果を示す図である。細胞が平たくなっているのは、分化した証拠である。C)THP-1と分化させたTHP-1(THP-1+PMA)を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。縦軸は細胞数、横軸はFITC強度を示す。

[図7]A)分化させたTHP-1細胞表面を#33抗体と免疫沈降した時の、沈降物の電気泳動結果を示す図である。B)PBMCを#33抗体と抗CD51抗体または#33抗体と抗CD61抗体を用いてフローサイトメトリーで解析した結果を示す図である。

[図8]#33による血小板凝集への影響について検討した結果を示す図である。

[図9]血小板存在下における#33抗体のIFN $\gamma$ 産生抑制効果を示す図である。括弧内の数字は、PRP/PBMC比(体積比)を示す。

[図10]F(ab')<sub>2</sub>化した#33抗体によるIFN $\gamma$ 産生抑制効果を示す図である。括弧内の

数字は、#33抗体濃度( $\mu$ g/ml)を示す。

[図11]#33抗体の重鎖可変領域の配列および該配列中におけるCDRの位置を示す図である。枠内は、CDR1-3に該当する領域である。

[図12]#33抗体の軽鎖可変領域の配列および該配列中におけるCDRの位置を示す図である。枠内は、CDR1-3に該当する領域である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0014] 本発明は、CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する物質(以下、「本発明物質」)またはその誘導体を提供する。本発明は、抗CD61抗体、すなわちCD61タンパク質結合能を有する物質が各種炎症性サイトカインの産生を抑制することを、本発明者らが初めて見出したことに基づく。

[0015] 一般的に、炎症性サイトカインとは炎症症状をもたらすサイトカインの総称であり、例えば、IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ は炎症性サイトカインの好適な例である。本発明における炎症性サイトカイン産生抑制作用とは、上記具体例に限らずいずれかの炎症性サイトカインを抑制すればよく、また、複数の炎症性サイトカインについて、同時にあるいは時間が前後して、産生抑制効果を有していてもよい。

[0016] 一方、CD61とは、細胞表面分子のサブユニットとして知られるタンパク質であり、インテグリン $\beta_3$ -サブユニット、インテグリン $\beta_3$ 鎖等の別名を持つ。CD61はCD41、CD51と複合体を形成し、インテグリンファミリーに属する細胞表面分子CD41/CD61、CD51/CD61として機能する。CD41/CD61は $\alpha$ IIb $\beta$ 3ともいい、血小板、巨核球系に特異的に発現し、血小板においてフィブリノーゲンやvon Willebrand因子のレセプターとして機能し、血小板凝集や血小板粘着の中核をなす。また、CD51/CD61は $\alpha$ V $\beta$ 3ともいい、血管内皮細胞、破骨細胞、マクロファージ、血小板などに存在する。血管内皮等で細胞の接着・増殖・遊走に関与し、さらに血管新生や血管内膜肥厚などに関与している。本発明におけるCD61タンパク質結合能は、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する限り、その結合領域や結合強度を問わない。

[0017] 本発明物質が炎症性サイトカイン産生抑制作用を有することから、本発明物質の投与は高サイトカイン血症の治療または予防に有効であると考えられる。高サイトカイン血症は、血中のサイトカインが上昇した病態をいい、例えば、敗血症(sepsis)、全身

性炎症症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS)、血球貪食症候群 (HPS)、川崎病などの疾患や手術侵襲の場合において、高サイトカイン血症が観察される。また、本発明物質は敗血症を含む炎症性疾患の治療または予防に応用し得る。上述のとおり、炎症性サイトカインは炎症性疾患の成立、敗血症の憎悪等に関与していることが知られている。炎症性疾患とは、炎症症状を呈する疾患をいい、たとえば、敗血症や自己免疫疾患はその例である。また、SIRS(systemic inflammatory response syndrome)、感染に起因する敗血症、敗血症ショック、重症敗血症は、いずれも本発明における敗血症に含まれる。

[0018] このような本発明物質として、デオキシリボ核酸、リボ核酸、タンパク質、ペプチド、低分子物質を例示することができる。例えば、CD61のリガンドであるフィブリノゲンや、そのエピトープであるRGD配列、これらの誘導体は本発明物質となる可能性を有する。好適な例としては、抗CD61抗体を挙げることができる。

[0019] 抗体は、免疫グロブリンとも呼ばれるタンパク質である。抗体にはIgM, IgD, IgG, IgE, IgAからなる5つのクラスが存在する。IgGはさらに、IgG1-IgG4の4つのサブクラスに分けられる。どのクラスの抗体も、2本の重鎖(H鎖)および2本の軽鎖(L鎖)を構成単位として有する。1本の重鎖と1本の軽鎖がジスルフィド結合および非共有結合により結合し、さらにこの重鎖が、もう1本の軽鎖と結合した重鎖とジスルフィド結合および非共有結合により結合することにより、抗体分子が構成されている。重鎖は $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ の5種類があり、抗体のクラスを決定するが、軽鎖はどのクラスも共通であり、 $\kappa$ 鎖または $\lambda$ 鎖である。重鎖は約440アミノ酸残基、軽鎖はその約半分のアミノ酸残基から構成される。重鎖および軽鎖ともにN末端から約110残基の配列は抗体分子間で変化に富むため、可変領域と呼ばれている。可変領域には、抗原特異性を決定するCDR(complementary determining region、相補性決定領域)が存在する。CDRにはCDR1,2,3の3種類が存在し、それぞれ約5-10アミノ酸残基の領域である。CDRは、N末端側からCDR1-3の順で、重鎖、軽鎖それぞれに配置されている。CDRは超可変領域(hypervariable region)とも呼ばれることもある。CDR以外の変領域はフレームワークと呼ばれ、比較的保存性が高い。可変領域以外は定常領域と呼ばれ、同じクラスまたはサブクラスである抗体において同一である。



- [0020] 本発明の抗CD61抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体であってもよいが、均質かつ安定に生産される抗体であることが望ましい。また、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体断片、さらに、抗CD61抗体の変異体も本発明に用いることができる抗CD61抗体の例である。本明細書において、キメラ抗体とはヒト由来の定常領域およびヒト以外の動物由来の可変領域を融合させた抗体であり、ヒト化抗体とはヒト以外の動物由来の抗体のCDRのみをヒト由来のCDR以外の抗体(定常領域、フレームワーク)と融合させた抗体である。また抗体断片とは、全長抗体の一部をさし、一般に、抗原結合領域または可変領域を含む断片のことである。例えば、Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv(single chain Fv)は本発明における抗体断片の好適な例である。
- [0021] 本発明の抗CD61抗体は、炎症性サイトカイン産生抑制効果を有する限り、エピトープについて特に問わない。このような抗CD61抗体の例としては、クローンSZ21や#33抗体を挙げることができる。好ましい抗体の例の1つは、#33抗体である。
- [0022] 本発明における#33抗体とは、今回、本発明者らによって作製された抗PBMC抗体のうち、種々の炎症性サイトカインに対する抑制効果が具体的に確認された抗体であって、抗原をCD61とするマウス抗ヒトCD61抗体である。#33抗体は、実施例に詳述するように、少なくともIFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ に対し抑制的に働くことが確認されている。また、#33抗体は、後述する本発明におけるIL-10産生誘導効果を有する。#33抗体のアイソタイプはIgG2a,  $\kappa$ で、SDS-PAGE(還元剤入り)で展開すると、H鎖が約55kDa、L鎖が約30kDaの位置にそれぞれバンドを観察することができる。また#33抗体の可変領域、CDR1-3のアミノ酸配列およびcDNA配列は、実施例で後述するとおり、本発明者らによって特定された。これら配列を下記の配列番号に示す。また、可変領域中のCDRの位置を図11に示す。
- 配列番号1:#33重鎖CDR1 アミノ酸配列
- 配列番号2:#33重鎖CDR2 アミノ酸配列
- 配列番号3:#33重鎖CDR3 アミノ酸配列
- 配列番号4:#33重鎖可変領域 アミノ酸配列
- 配列番号5:#33軽鎖CDR1 アミノ酸配列
- 配列番号6:#33軽鎖CDR2 アミノ酸配列

配列番号7:#33軽鎖CDR3 アミノ酸配列

配列番号8:#33軽鎖可変領域 アミノ酸配列

配列番号9:#33重鎖CDR1 DNA配列

配列番号10:#33重鎖CDR2 DNA配列

配列番号11:#33重鎖CDR3 DNA配列

配列番号12:#33重鎖可変領域 DNA配列

配列番号13:#33軽鎖CDR1 DNA配列

配列番号14:#33軽鎖CDR2 DNA配列

配列番号15:#33軽鎖CDR3 DNA配列

配列番号16:#33軽鎖可変領域 DNA配列

すなわち#33抗体は、「重鎖ポリペプチドが配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」、「配列番号1から配列番号3に記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体」、「軽鎖ポリペプチドが配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」「配列番号5から配列番号7に記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体」として標記することができる。

[0023] #33抗体は、ヒトCD61またはヒトPBMCを抗原として公知の方法にしたがって調製することができる。ポリクローナル抗体であれば、マウスに抗原を注射して抗体を産生させ、採取した血液をアフィニティークロマトグラフィーによって精製すればよい。モノクローナル抗体であれば、ハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975))や、本発明者らによって明らかにされた可変領域の配列に基づき、組換え方法(米国特許第4816567号)などによることができる。このようにして調製した抗体が#33抗体であるかどうかの確認は、当業者にとって周知の方法によって行うことができる。例えば、プロテインシークエンサーを用いて、被験抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定し、配列番号4または配列番号8に記載のアミノ酸配列と同一であるかを確認することで、#33抗体であることを同定し得る。可変領域のDNA配列をDNAシークエンサーで決定し、配列番号12または配列番号16と比較してもよい。または、

CDRのアミノ酸配列またはDNA配列を決定し、配列番号1-3、5-7、9-11、13-15に記載の配列と比較してもよい。

[0024] また、「重鎖ポリペプチドが配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」、「軽鎖ポリペプチドが配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」には、#33抗体のみならず、改変された#33抗体も含まれる。このような改変された#33抗体も、本発明の抗CD61抗体として好ましい例である。上記の改変された#33抗体は、#33抗体の可変領域を有することを特徴とする。具体的には、重鎖の可変領域のアミノ酸配列が配列番号4に記載の配列であって、定常領域がマウス以外の動物、例えばヒト、の定常領域を有するキメラ抗体軽鎖の可変領域のアミノ酸配列が配列番号8に記載の配列であって、定常領域がマウス以外の動物、例えばヒト、の定常領域を有するキメラ抗体、上記キメラ抗体の抗体断片が含まれる。

[0025] 上記改変された#33抗体は、公知方法によって調製することができる。「重鎖ポリペプチドが配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」、「軽鎖ポリペプチドが配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」であるキメラ抗体であれば、#33抗体重鎖の可変領域遺伝子(配列番号4)および#33抗体軽鎖の可変領域遺伝子(配列番号8)を、#33抗体産生ハイブリドーマから公知手法により調製し、または、核酸合成装置により合成して調製する。該可変領域遺伝子を、ヒト等の動物由来抗体の定常部の遺伝子と融合させて発現ベクターを作製し、該発現ベクターを適当な宿主にトランスフェクションし、目的の抗体を調製することができる。抗体定常部の配列は、例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest FIFTH EDITION 1991, Elvin A. Kabat et al, NIH Publication No. 91-3242から入手可能である。キメラ抗体の調製方法の解説は、特許文献「特開平7-194384」等に記載がある。また、各種抗体断片の調製方法も、公知手法によることができる(例えば、金光 修著日本技術士会監修「抗体工学入門」、地人書館、ISBN4-8052-0456-7)。

[0026] また、「配列番号1から配列番号3に記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体」、

「配列番号5から配列番号7に記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR (complementary determining region) のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体」にも、#33抗体のみならず、改変された#33抗体が含まれる。このような改変された#33抗体も、本発明の抗CD61抗体として好ましい例である。上記の改変された#33抗体は、#33抗体のCDRを有することを特徴とする。具体的には、配列番号1から配列番号3に記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR (complementary determining region) のアミノ酸配列として含み、配列番号5から配列番号7に記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR (complementary determining region) のアミノ酸配列として含むヒト化抗体、該ヒト化抗体の抗体断片が含まれる。

[0027] 上記ヒト化抗体も、公知方法による調製が可能である。例えば、核酸合成装置により合成して調製した#33抗体重鎖のCDR遺伝子 (配列番号4) および#33抗体軽鎖のCDR遺伝子 を、ヒト由来抗体のフレームワークおよび定常部の遺伝子と融合させて発現ベクターを作製し、該発現ベクターを適当な宿主にトランスフェクションし、目的の抗体を調製することができる。ヒト抗体定常部、フレームワークの配列は、例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest FIFTH EDITION 1991, Elvin A. Kabat et al, NIH Publication No. 91-3242から入手可能である。ヒト化抗体の調製方法は、特許文献:「US5225539」、「EP239400」、「特許2912618」、「特許2828340」、「特開平11-4694」、「特開平11-243955」、非特許文献:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 vol. 86, p10029-10033, A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, Cary Queen et al等に記載がある。また、各種抗体断片の調製方法も、公知手法によることができる。

[0028] また、#33抗体に類似する抗CD61抗体変異体も、本発明の抗CD61抗体として好ましい例である。このような抗体の態様の例として、「重鎖ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列番号4に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」(以下、「重鎖変異体」と省略する。), 「軽鎖ポリペプチドが、配列番号8に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列

番号8に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、抗CD61抗体」(以下、「軽鎖変異体」と省略する。)を挙げることができる。上記の変異体には、定常領域がマウス由来である抗体の他、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体断片も含まれる。

[0029] 本明細書において、「アミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列」において、アミノ酸の変異数は、ヒトCD61を認識する機能を維持する限り、特に制限はない。一般的には、重鎖または軽鎖可変領域のアミノ酸数の10%以内であり、好ましくは5%以内であり、より好ましくは1%以内である。重鎖変異体および軽鎖変異体における変異部位については、ヒトCD61を認識する機能を維持する限り、特に制限はない。CDRまたはフレームワークのいずれであってもよい。重鎖変異体における軽鎖、軽鎖変異体における重鎖のCDRの変異の有無は問わない。すなわち重鎖変異体および軽鎖変異体において、上記変異は重鎖のみまたは軽鎖のみに存在していてもよく、重鎖と軽鎖の両方に存在していてもよい。

[0030] 上記重鎖変異体および軽鎖変異体は、公知方法によって調製することができる。例えば、配列番号12または配列番号16に記載された可変領域DNA配列に対し、deletion-mutant法、PCR法等の公知部位特異的変異導入法またはランダム変異導入法改変法を施して変異を導入し、該可変領域配列をマウス由来またはヒト等のマウス以外の動物由来の定常領域遺伝子とライゲーションして発現ベクターを構築し、適当な宿主によって目的の上記抗体を得ることができる。あるいは、chain シャフリング法等の公知進化分子工学的手法によることもできる。chain シャフリング法は、重鎖または軽鎖の抗体可変領域遺伝子の一方を固定化し、他方を可変領域遺伝子ライブラリーと結合させたライブラリーを構築し、ファージ上に発現させ、もとの抗原に対する特異性が高い抗体可変領域の組み合わせをスクリーニングする方法である。このようにして調製した抗体が抗CD61抗体であるかどうかを確認するには、CD61を抗原としたときの抗原抗体反応を、公知イムノアッセイによって観察することで可能である。

[0031] 上記抗CD61抗体変異体がヒト抗体である場合は、例えば、トランスジェニック動物を用いた方法(特開平10-146194、特開平10-155492、特許2938569、特許3030092、石田功ら、Bioベンチャー Vol.2, No.4 ,2002, p44-50)や、ファージディスプレイライブ

ラリー法(伊東祐二, Bioベンチャー Vol.2, No.4 ,2002, p51-58、中島敏博, Bioベンチャー Vol.2, No.4 ,2002, p59-66)等の公知手法によって、調製することができる。

[0032] また、#33抗体に類似する抗CD61抗体変異体の別の態様の例として、「下記(a)または(b)のいずれかに記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体、(a)配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列、(b)配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR(complementary determining region)として機能するアミノ酸配列」(以下において、「重鎖CDR変異体」と省略する。)を挙げることができる。この変異体は、重鎖のCDR1-3のアミノ酸配列が、#33抗体重鎖のCDR1-3のアミノ酸配列および#33抗体重鎖のCDR1-3のアミノ酸配列に変異が加わった配列の中から選択されるアミノ酸配列であることを特徴とする。また別の態様の例として「下記(a)または(b)のいずれかに記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体、(a)配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列、(b)配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR(complementary determining region)として機能するアミノ酸配列」(以下において、「軽鎖CDR変異体」と省略する。)を挙げることができる。この変異体は、軽鎖のCDR1-3のアミノ酸配列が、#33抗体軽鎖のCDR1-3のアミノ酸配列および#33抗体軽鎖のCDR1-3のアミノ酸配列に変異が加わった配列の中から選択されるアミノ酸配列であることを特徴とする。

[0033] 重鎖CDR変異体および軽鎖CDR変異体において、CDRの変異部位についても、ヒトCD61を認識する機能を維持する限り、特に制限はない。またCDRの変異は、CDR1-3のいずれか1つのみに存在してもよく、いずれか2つ、あるいは3つ全てに存在していてもよい。また重鎖CDR変異体における軽鎖の変異の有無、軽鎖CDR変異体における重鎖の変異の有無は問わない。

- [0034] 重鎖CDR変異体および軽鎖CDR変異体の調製および抗CD61抗体であることの確認は、上述の、重鎖変異体および軽鎖変異体の調製法と同様の公知手段によって行うことができる。
- [0035] 抗CD61抗体は、CD61またはPBMCを抗原として公知の方法にしたがって調製することができる。ポリクローナル抗体であれば、ウサギ、ラット等の動物に抗原を注射して抗体を産生させ、採取した血液をアフィニティークロマトグラフィーによって精製すればよい。モノクローナル抗体であれば、ハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975))や、組換え方法(米国特許第4816567号)などによることができる。また、抗CD61抗体の変異体は、特定の遺伝子DNAに対してPCR法等によりランダムな変異を導入して変異体を作製するランダム変異導入法や、抗体可変領域のVHまたはVL遺伝子の一方を固定化し、他方をV遺伝子ライブラリーと結合させたライブラリーを構築し発現させ、もとの抗原に対する特異性が高い抗体可変領域の組み合わせをスクリーニングするchainシャプリング法等によって調製できる。F(ab')<sub>2</sub>は、IgGをペプシンで消化し、Fc部分を切り離して調製する。このとき、pH、消化時間、ペプシンの量は適宜調整する。
- [0036] 抗CD61抗体であることの確認は、抗原であるCD61との親和性をみることで行うことができる。抗原との親和性の確認は、通常、抗体調製時に抗体のスクリーニングとして行われる。抗体の親和性は、飽和結合、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)等によって決定できる。
- [0037] その他の本発明物質についても、後述するスクリーニング方法による他、公知方法によって調製することができる。例えば、調製しようとする本発明物質がタンパク質であれば、ウエストウエスタン法、ツークハイブリッド法や免疫沈降法などの公知方法によって、候補物質群の中から、CD61タンパク質と結合するタンパク質をスクリーニングすることができる。また、表面プラズモン共鳴(SPR)により分子間相互作用を解析する装置(例としてBIAcore)を利用してスクリーニングすることもできる。このようにしてスクリーニングした物質について、炎症性サイトカイン産生抑制作用を確認してさらに選択し、アフィニティカラム等を用いて精製することにより、本発明物質を調製することができる。炎症性サイトカイン産生抑制作用の確認は、実施例にあるように、被験物

質である物質を炎症性サイトカイン産生細胞に接触させ、該細胞による炎症性サイトカインの産生量を該被験物質接触前と接触後で比較し、接触後の産生量が接触前より減少しているかどうかを観察することで、判断することができる。炎症性サイトカインの量の測定は、HPLC法や、ELISA法等の抗サイトカイン抗体を用いた各種抗体法により実施することができる。

[0038] さらに調製しようとする本発明物質が低分子であれば、例えば、コンビナトリアルケミストリーによって作られたライブラリーの低分子物質を公知方法によってハイスループットスクリーニングすることにより、調製することができる (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9)。

[0039] また本発明物質は、IL-10産生誘導効果を有していてもよい。本発明におけるIL-10産生誘導効果とは、IL-10産生細胞からのIL-10産生分泌開始時点を早める効果も含む。IL-10産生分泌開始時点を早める効果が確認される場合は、物質添加または投与時のIL-10産生総量が物質非添加または投与時と比較して増加していなくても、本発明におけるIL-10産生誘導効果があると認められる。IL-10産生誘導効果の確認は、実施例記載のように、IL-10産生細胞により分泌されたIL-10量を、抗IL-10抗体を用いてELISA法等の各種公知免疫法により実施することができる。また、時間経過を追って測定することで、IL-10産生分泌開始時点を早める効果の有無を確認することができる。

[0040] また本発明は、上記本発明物質の誘導体を提供する。本発明物質の誘導体の例として、本発明物質のプロドラッグ、すなわち、誘導体自身はCD61タンパク質結合能または／および炎症性サイトカイン産生抑制作用を有しないが、体内投与後にCD61タンパク質結合能および炎症性サイトカイン産生抑制作用を発揮する物質となる物質を挙げることができる。プロドラッグである上記物質の誘導体は、上記物質と同様に、



炎症性疾患や高サイトカイン血症の治療または予防に有用であると考えられる。

- [0041] 本発明物質またはその誘導体を医薬品として利用する場合は、定法に従って適宜製剤化することができる。該製剤は、薬理学的に許容される担体や添加剤を含むことができる。例えば、界面活性剤、賦形剤、安定剤、保存料、懸濁剤、等張化剤などを含んでもよい。剤形についても、投与経路や適用患者を考慮して、注射剤、錠剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤等の公知剤形から、適切な剤形を選択することができる。
- [0042] 本発明は、#33抗体の可変領域をコードするDNAを提供する。上述のとおり、本発明者らによって#33抗体可変領域のcDNAが同定された。#33抗体重鎖可変領域および#33抗体軽鎖可変領域は、いずれも#33抗体の抗CD61抗体としての特異性の決定に関わる領域である。上述のとおり、#33抗体重鎖可変領域について、アミノ酸配列を配列番号4、cDNA配列を配列番号12に、#33抗体軽鎖可変領域について、アミノ酸配列を配列番号8、cDNA配列を配列番号16に記載した。
- [0043] 上記#33抗体の可変領域のcDNAは、当業者に周知の手段により調製することができる。#33抗体産生ハイブリドーマから公知手段によりmRNAを調製し、該mRNAからRT-PCR法により目的のDNAを調製することができる。具体的には、実施例の方法によることができる。配列番号12または配列番号16に記載の配列に基づき、DNA合成装置を用いて合成して調製してもよい。
- [0044] また本発明は、#33抗体の可変領域のcDNAに類似するDNAを提供する。このようなDNAには、配列番号12にまたは配列番号16に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAが含まれる。さらに、配列番号4または配列番号8に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入、および／または置換されたアミノ酸配列をコードするDNAが含まれる。このようなDNAには、#33抗体以外のマウス抗CD61抗体の可変領域cDNA、ヒト抗CD61抗体を含むマウス以外の動物由来抗CD61抗体の可変領域cDNA、人工的に作出した#33抗体変異体の可変領域cDNAが含まれる。
- [0045] 上記#33抗体の可変領域のcDNAに類似するDNAは、公知手段により調製することができる。例えば、配列番号9-16のいずれかに記載の配列またはその一部をブロー

ブとして、ハイブリダイゼーション技術により#33抗体以外の各種抗CD61抗体cDNAの中から単離して調製することができる。また、配列番号9また配列番号16に記載の配列の一部をプライマーとし、抗CD61抗体mRNAからPCR法により調製することができる。または、配列番号12または配列番号16の配列に対し、公知遺伝子改変方法を施して調製することもできる。DNA合成装置による調製も可能である。

[0046] 上記ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM Hepes pH7.0、10×デンハルト溶液、20 μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度で、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素(例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上(例えば、98から99%)の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol.

Biol.215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

[0047] 上記の#33抗体の可変領域のcDNA、#33抗体の可変領域のcDNAに類似するDNAは、#33抗体、#33抗体の重鎖変異体、#33抗体の軽鎖変異体、これらのキメラ抗体、これらの抗体断片の製造、#33抗体に類似する抗CD61抗体変異体に使用することができる。上記製造においては、上記の#33抗体の可変領域のcDNA、#33抗体の可変領域のcDNAに類似するDNAをベクターに挿入してから宿主細胞に導入してもよく、上記cDNAまたはベクターが導入された形質転換体から目的の抗体を得ることができる。ベクターは目的や宿主細胞に応じたものを選択することができ、あらかじめ定常領域DNAが挿入されていてもよい。ベクターの具体例としては、plasmid pVk1を挙げることができる。また、抗CD61抗体の検出のためのプローブとして使用することができる。

[0048] 本発明は、#33抗体のCDRをコードするDNAを提供する。上述のとおり、本発明者らによって#33抗体CDRのcDNAが同定された。#33抗体重鎖CDR1-3および#33抗体軽鎖CDR1-3は、いずれも#33抗体の抗CD61抗体としての特異性の決定に関わる最も重要な領域である。上述のとおり、#33抗体重鎖可変CDR1について、アミノ酸配列を配列番号1、cDNA配列を配列番号9に、#33抗体重鎖可変CDR2について、アミノ酸配列を配列番号2、cDNA配列を配列番号10に、#33抗体重鎖可変CDR3について、アミノ酸配列を配列番号3、cDNA配列を配列番号11に、#33抗体軽鎖可変CDR1について、アミノ酸配列を配列番号5、cDNA配列を配列番号13に、#33抗体軽鎖可変CDR2について、アミノ酸配列を配列番号6、cDNA配列を配列番号14に、#33抗体軽鎖可変CDR3について、アミノ酸配列を配列番号7、cDNA配列を配列番号15に記載した。

[0049] 上記#33抗体のCDRのcDNAは、当業者に周知の手段により調製することができる。例えば、配列番号9から配列番号11のいずれかまたは配列番号13から配列番号15のいずれかに記載の配列に基づき、DNA合成装置を用いて合成して調製することが

できる。

[0050] また本発明は、#33抗体のCDRのcDNAに類似するDNAを提供する。このようなDNAには、配列番号9から配列番号11、配列番号13から配列番号15のいずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAが含まれる。さらに、配列番号1から配列番号3、配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入、および／または置換されたアミノ酸配列をコードするDNAが含まれる。このようなDNAには、#33抗体以外のマウス抗CD61抗体のCDRcDNA、ヒト抗CD61抗体を含むマウス以外の動物由来抗CD61抗体のCDRcDNA、人工的に作出した#33抗体変異体のCDRcDNAが含まれる。

[0051] 上記#33抗体のCDRのcDNAに類似するDNAは当業者に公知の手法により調製することができる。配列番号9から配列番号11、配列番号13から配列番号15のいずれかに記載の配列に対し、上述の公知遺伝子改変方法を施して調製することができる。DNA合成装置による調製も可能である。配列番号9から配列番号11、配列番号13から配列番号15のいずれかに記載のDNAをプローブとして#33抗体以外の各種抗CD61抗体cDNAの中から単離して調製することも可能である。

[0052] 上記の#33抗体のCDRのcDNA、#33抗体のCDRのcDNAに類似するDNAは、#33抗体、#33抗体の重鎖CDR変異体、#33抗体の軽鎖CDR変異体、これらのヒト化抗体、ヒト抗体であるこれらの抗体断片、#33抗体に類似する抗CD61抗体変異体の製造に使用することができる。さらにはヒト抗体製造用トランスジェニック動物の製造においても使用することができる。上記製造においては、上記の#33抗体のCDRのcDNA、#33抗体のCDRのcDNAに類似するDNAをベクターに挿入してから宿主細胞に導入してもよく、上記cDNAまたはベクターが導入された形質転換体から目的の抗体を得ることができる。ベクターは目的や宿主細胞に応じたものを選択することができ、あらかじめ定常領域やフレームワークのDNAが挿入されていてもよい。。ベクターの具体例としては、plasmid pVk1を挙げることができる。また、抗CD61抗体の検出のためのプローブとして使用することができる。

[0053] 本発明は、本発明物質またはその誘導体を用い、炎症性サイトカインの産生を抑制する方法を提供する。本発明の方法は、in vivo またはin vitroで実施することがで

きる。例えば、本発明の物質またはその誘導体を実験動物や培養細胞に投与し、これら実験動物、培養細胞での炎症性サイトカインの産生を抑制することができる。これにより本発明の方法はサイトカインの関与する生物学的反応を解明するための手法となりうる。また、本方法は、研究分野だけでなく、上述のとおり、医療の分野でも有効な方法となり得る。すなわち、本発明物質またはその誘導体を、炎症や高サイトカイン血症を伴う患者あるいはその素因を有する患者に投与することにより、炎症性疾患や高サイトカイン血症の予防や治療に用いることができる。

[0054] また本発明は、炎症性疾患治療または高サイトカイン血症治療における上記医薬品の有効性を判定する方法を提供する。本発明の判定方法により、個々の患者に対し、上記医薬品による治療が有効であるかどうかを、治療前にin vitroで判断することができ、臨床現場にいわゆるテーラーメイド治療をもたらすことができる。なお、CD61変異と関連が明らかとなっている疾病として、血小板無力症が挙げられる。ある種のCD61変異がフィブリノゲン結合に影響する結果、血小板凝集が阻害されて出血傾向となる。上述のCD61変異には、1アミノ酸配列の変異があることが知られており、D119Y(119番目アミノ酸がDからYに変異、以下同様)、R214Q、R214W、S752Pが特定されている。また、無症状型変異としては、L33P、R143Q、P407A、R439Q、R636Cが知られている。この疾患発症と炎症性サイトカインとの関連があれば、本発明の方法を適応できる可能性も考えられる。

[0055] 本発明の方法は、検体を抗CD61抗体と接触させる工程を含む。

本発明の方法の一例を挙げる。まず、一の被験者から採取した末梢血または末梢血単核球(以下、被験者検体)にサイトカイン産生誘導剤を添加し、炎症性サイトカイン産生を惹起する。サイトカイン産生誘導剤は、例えばLPSを用いることができる。次に、上記処理を行った被験者検体を分け、一方の検体に抗CD61抗体を添加する。別の一方はコントロールとする。両検体中のサイトカイン産生量をELISA法等によりそれぞれ測定する。測定するサイトカインは、炎症性サイトカインの中から選択することができる。抗CD61抗体を添加した検体中の炎症性サイトカイン量が、コントロール中の炎症性サイトカイン量よりも低ければ、上記医薬品による治療が有効と認められる。

[0056] また別の例として、被験者検体のサイトカイン産生量を測定した後、同検体に抗

CD61抗体を添加し、さらに抗体添加後の検体中のサイトカイン産生量をELISA法等により測定する。抗体添加前後の測定値を比較し、抗体添加後の値が添加前よりも低ければ、上記医薬品による治療が有効と認められる。この方法は、既に血中サイトカイン量の上昇が確認されている患者等について適用できる。

[0057] なお、被験者検体の好適な例として末梢血または末梢血単核球を挙げたが、検体はこれに限定されず、炎症が生じている患部組織などを用いてもよい。

[0058] 本発明の方法に必要な試薬類は、予め組み合わせてキットとすることができる。キットを構成する試薬の一つは、抗CD61抗体を成分とする。他には、必要に応じて、サイトカイン測定用試薬類、サイトカイン誘導剤、適当な希釈液などを含むことができる。サイトカイン測定用試薬類は、サイトカインを測定する方法にもよるが、例えばELISA法であれば、抗サイトカイン抗体、酵素標識抗体、基質をそれぞれ成分とする試薬類を例示することができる。

[0059] 本発明は、上述の本発明物質のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、CD61発現細胞にサイトカイン産生誘導剤および被験物質を接触させる工程、および炎症性サイトカインの量を測定し、サイトカイン産生誘導剤のみを接触させた対照と比較して、サイトカイン産生量を低下させた被験物質を選択する工程を含む。

[0060] 「CD61発現細胞にサイトカイン産生誘導剤および被験物質を接触させる工程」について説明する。例えば、96wellプレートにCD61発現細胞をまき、各well中にサイトカイン産生誘導物質と被験物質を同時にまたは前後して添加することにより、これらの物質をCD61発現細胞に接触させる。ここで被験物質とは、スクリーニング対象となる物質である。CD61発現細胞の一例としてPBMCを、サイトカイン産生誘導物質の一例としてはLPSを挙げることができる。また、対照として、CD61発現細胞にサイトカイン産生誘導物質のみ接触させ、被験物質は接触させないものを用意する。次に、「炎症性サイトカインの量を測定し、サイトカイン産生誘導剤のみを接触させた対照と比較して、サイトカイン産生量を低下させた被験物質を選択する工程」を説明する。上述の例でいえば、各well上清中の炎症性サイトカインの量をELISA法等で測定する。対照の細胞上清についても同様に測定する。「サイトカイン産生誘導剤のみを接触さ

せた」とは、サイトカイン産生誘導剤を接触させたが被験物質は接触させていないという意味である。測定する炎症性サイトカインは、任意の炎症性サイトカインを選ぶことができるが、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1、IL-6は測定する炎症性サイトカインとして好適な例である。得られた測定値を対照と比較し、well上清測定値が対照よりも低いwellを選択することにより、被験物質のなかから目的とする物質を選択する。このようにして選択された物質は、CD61結合能を有する可能性を持ち、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有することから、上述したように、炎症性サイトカイン産生抑制剤、炎症性疾患や高サイトカイン血症の予防または治療用医薬品として使用することが可能である。

[0061] 上述のスクリーニングの後、さらに二次スクリーニングを行い、上述スクリーニング方法により選択された物質(以下、一次選択物質)の中から、その活性がCD61に依存しているものを選択することができる。例えば、96wellプレートにCD61発現細胞をまき、一次選択物質および標識抗CD61抗体を添加する。各well上清をサンプルとし、このサンプルについてフローサイトメトリーを実施し、対照に比べて、反応が低いサンプルを選択する。ここで対照とは、標識抗CD61抗体は添加したが一次選択物質は添加していないCD61発現細胞のサンプルである。フローサイトメトリーの結果、対照よりも反応が低いサンプルは、抗CD61抗体と細胞表面のCD61との結合を該サンプル中の一次選択物質が競合阻害していると考えられる。したがって、この二次スクリーニングによって選択された物質は、CD61に依存した炎症性サイトカイン産生抑制作用を有するということができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0062] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

### (実施例1)モノクローナル抗体の作製

内在的にサイトカインを制御する機能抗体の取得を試みた。まず、免疫原として用いるPBMCをヒト血液から調製した。健常者からヘパリン採血した血液を、RPMI(シグ

マ R8340)で2倍に希釈したのち、Histopacue1077(シグマ)に重層した。遠心(800 x G, 30min)後、中間層(白血球画分)をとりだし、溶血用バッファー(150mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH7.2-7.4)で処理して赤血球を除いたものを PBMCとした。

[0063] 免疫動物はマウスBalb/cを使用した。免疫開始日の前日にComplete Adjuvant (Freund、ヤトロン)を50  $\mu\text{l}$ 注入した後、マウスのfoot padに上記PBMCを $2.0-5.0 \times 10^5$  cellsずつ5日おきに4回注入して免疫した。免疫後に取り出したマウス足リンパ節をほぐし、リンパ細胞を得た。該リンパ細胞について、ポリエチレングリコール(PEG, ナカライ)を用いてMyeloma P3U1細胞と融合させた。

[0064] ハイブリドーマを2%のHAT溶液(GibcoBRL)を含む15%FCS, 終濃度5ng/ml の Streptomycin/Penicillin(Gibco BRL) 入りRPMI(シグマ)選択培地で培養した後、該ハイブリドーマのイムノグロブリン産生能をサンドイッチELISAで確認し、ハイブリドーマの上清中にイムノグロブリンを産生しているハイブリドーマを選択した。サンドイッチELISAは、MBLで販売している抗マウスIgG抗体(BS-AU271)を感作抗体(終濃度2  $\mu\text{g/ml}$ で感作)として、またペルオキシターゼ標識抗マウスIgG抗体(IM-0817)を検出抗体(500倍希釈して検出)として用いて実施した。

[0065] イムノグロブリンを産生しているハイブリドーマについて、フローサイトメトリーによりPBMCに反応する培養上清を選択した。フローサイトメトリーは、サンプルPBMC( $1.0 \times 10^5$  Cells/sample)に対して50  $\mu\text{l}$ の培養上清で染色を行い、2次抗体にFITC標識抗マウス抗体(MBL販売品)を用いて実施した。

[0066] PBMCに反応性を示す培養上清を産生するハイブリドーマについて、限界希釈により単クローン化した。単クローン化したクローンについて、精製後SDS-PAGEにより産生するH鎖(およそ55kDa)、L鎖(およそ30kDa)が単一バンドであることを確認した。単クローン化が確認できたクローンの中から、その培養上清がPBMCのサイトカイン産生に影響を与えるものを選抜し、#33抗体産生クローンを得た。サイトカイン産生への影響を調べる方法は、実施例2に記載した方法と同様である。

[0067] 単クローン化した#33抗体産生クローンを、10%FCSを含む終濃度5ng/mlの Streptomycin/Penicillin(Gibco BRL) RPMIでさらに培養し、精製に用いる培養上清を



得た。ハイブリドーマ(マウスリンパ細胞/P3U1)培養上清中のIgGをProteinA(アマシヤムファルマシア)カラムを用いて精製した。洗浄用Bufferとして50mM Tris-HCl(PH8.8), 3M NaClを、溶出Bufferとして0.17M Glycine-HCl (PH2.3)を用いた。50%グリセロール/PBSを用いて溶出されたIgGの透析を行った。抗体 # 33を0.22  $\mu$  m Membrane(ミリポア)を用いて滅菌ろ過した。

[0068] 抗体のアイソタイプはアイソストリップキット(Roche)を用いて決定した。#33抗体のアイソタイプはIgG2a,  $\kappa$ であった。

[0069] (実施例2)#33抗体によるPBMCのサイトカイン産生への影響の解析

#33抗体がPBMCのサイトカイン産生に与える影響を調べるため、PBMCにサイトカイン産生刺激物質と#33抗体を添加して培養し、PBMCによる各種サイトカイン産生量を調べた。

[0070] PBMCは、末梢血からHISTOPAQUE-1077(シグマ)を利用して上述のとおり単離したものをを用いた。単離した細胞を $1.0 \times 10^5$  cells/wellで96wellのプレートにまいた。培地はStreptomycin/Penicillin (GibcoBRL), 10% FCS(Equitech)を添加したRPMI(シグマ)を用いた。

[0071] サイトカイン産生刺激物質として、非メチル化DNAのCpGモチーフ部分(GAC30: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG; QIAGEN社にカスタム合成依頼)、グラム陰性細菌菌体成分であるLPS(シグマ)、ウイルス2本鎖RNA類似物であるPoly(I:C)(シグマ)を用いた。CpG;終濃度 $10 \mu$  M、LPS;終濃度 100ng/ml、Poly(I:C);終濃度 100ng/mlの条件で各刺激物質を上記細胞に添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で2晩培養した。#33抗体はサイトカイン産生刺激物質と同時に上記細胞に添加した。培養上清を回収し、各種サイトカイン産生量を市販のELISAキットで測定して、#33抗体がPBMCのサイトカイン産生に与える影響を検討した。測定キットは、IM-1743 (IFN  $\gamma$ ), IM-1121 (TNF  $\alpha$ ), IM-0755 (IL-1  $\alpha$ ), IM-1987 (IL-10), IM-3582 (IL-1  $\beta$ ) (全てMBL)を使用した。

[0072] さらに、PBMCによるサイトカイン産生量の経時的変化についても検討した。単離したPBMCを $1.0 \times 10^6$  cells/wellで12wellのプレートに培養し、刺激添加から1, 2, 5, 10, 22, 32, 44, 56, 68, 80時間後に一定量の培養上清をサンプリングし、各種サイトカイン

ン産生量を測定した。#33抗体はPBMCに刺激を添加する際に終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ で添加した。また、他の抗CD61抗体として市販抗CD61抗体(SZ21, BC社)、およびコントロールとしてマウスIgG2a(MBL)アイソタイプコントロールをそれぞれ終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。

[0073] 結果を図1-図3に示す。今回得られたモノクローナル抗体の1つである#33は、PBMCによるIFN $\gamma$ の産生を著しく抑制した(図1D)。通常、IFN $\gamma$ の産生はPBMCを刺激後10時間目以降に検出されるが、#33抗体存在下では、IFN $\gamma$ の産生は刺激後40時間を経過してもほとんど見られなかった(図1D)。また#33は炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ やIL-1 $\alpha$ の産生も抑制することが分かった(図2)。そこで、TNF $\alpha$ およびIL-1 $\alpha$ 産生抑制効果、さらに代表的炎症性サイトカインであるIL-6に対する産生抑制効果についても、時間的経過を観察した。TNF $\alpha$ に関しては、#33抗体または抗CD61抗体を添加すると、産生開始時点が早まるが、その後の総量に関しては対象に比較して低い値を示した。IL-1 $\alpha$ 、IL-6に関しては、IFN $\gamma$ と同様に、#33抗体または抗CD61抗体の添加当初から、産生量が抑えられた(図1A-C)。これら結果より、#33抗体は複数種の炎症性サイトカインの産生を同時に抑制できることがわかった。

[0074] 一方、IL-10は通常、IFN $\gamma$ が産生されるのとはほぼ同時か、あるいは若干遅れて検出されるが(刺激後8-10時間目)、#33を刺激と同時に投与しておくと、その産生開始時間が5時間ほど早まることが判明した(図3A)。しかし、最終的なIL-10産生量に関しては対照と比べて有意差は認められなかった(図3B)。

[0075] (実施例3) #33抗体によるIFN $\gamma$ 産生抑制効果におけるIL-10関与の検討

一般的にIL-10はIFN $\gamma$ の産生を抑制することが知られている(非特許文献3)。そこで、#33抗体によるIFN $\gamma$ 産生促進にIL-10が関与しているかどうかについて検討した。

[0076] PMBCにPoly(I:C)を添加し、添加時(0hr)、添加3時間後(3hrs)、8時間後(8hrs)、20時間後(20hrs)にIL-10を添加し、刺激から48時間後にIFN $\gamma$ 産生量をELISA法で測定した。IL-10の代わりに#33抗体を用い、同様にIFN $\gamma$ 産生量の測定を行った。IL-10はシグマから入手したものをを用いた。結果を図4A、図5に示す。PBMCを刺激すると同時にIL-10を添加した場合は、#33を添加した実施例2と同様に、PBMCによ

るIFN  $\gamma$  の産生が抑制されたが、刺激後8時間目以降に添加した場合は、IFN  $\gamma$  産生に対する抑制効果が認めらなくなった(図4A)。一方、#33においては、PBMCの刺激後20時間経過してから投与しても、IFN  $\gamma$  の産生抑制が確認された(図5D)。さらに、同様にTNF  $\alpha$ 、IL-1  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ 、IL-6についても産生量の確認を行ったところ、これらサイトカインについても、サイトカイン産生誘導後しばらく時間が経過した後の#33抗体添加によって、同様にサイトカイン産生量が抑えられた。この結果は、#33抗体が敗血症に用いられることを想定した場合、既に高サイトカイン血症を発症してしまった敗血症患者について、#33抗体は外因性IL-10投与以上に有効に機能することを示唆する。

[0077] また、PBMCにPoly (I:C)、#33抗体およびIL-10中和抗体(R&D, MAB217)を同時に添加して、産生されてくるIFN  $\gamma$  を刺激から48時間後にELISA法で測定した。#33抗体は40ng/ml、IL-10中和抗体は1000ng/ml, 50ng/ml, 2.5ng/ml添加した。結果を図4Bに示す。#33によるIFN  $\gamma$  の産生抑制が濃度依存的に阻止された。

[0078] これらの結果は、#33によるIFN  $\gamma$  抑制効果がIL-10に依存していることを示唆している。つまり、刺激されたPBMCに#33を投与すると、IL-10の産生が促進され、その結果の1つとしてIFN  $\gamma$  や炎症性サイトカインの産生が抑制されていると考えられる。また、#33抗体は、PBMC刺激からの間隔が長くなっても添加効果が認められる点でIL10と異なることから、#33はIL-10産生促進効果以外にも、何らかの経路を介してPBMCによるIFN  $\gamma$  産生を抑制する機能を有していることが予想される。

[0079] (実施例4) #33抗体の抗原の同定

#33抗体の抗原を同定するため、各種ヒト培養細胞との反応性をフローサイトメトリーで調べた。細胞は、活性化マクロファージ様細胞THP-1、HPB-ALL, Jurkat, PM-1, Molt-4, KM-3, HL-60, K562, THP-1, U937, 293T, HUVECを用いた。活性化マクロファージ様細胞THP-1は、ヒト単球様細胞株THP-1にホルボールエステル(PMA) (シグマ)を終濃度5ng/ml添加したStreptomycin/Penicillin(GibcoBRL), 10%FCS (Equitech) 入りのRPMI(シグマ)で2日間培養して分化させた。

[0080] 各種ヒト培養細胞( $1.0 \times 10^5$  cells)に対して、1mg/ml Human IgG(シグマ) in FCSでブロッキングを行ったのち、終濃度1  $\mu$  g/ml #33を含む2%FCS(Equitech)を含むPBS

溶液中で、4℃、30分間反応させた。2%FCS (Equitech)を含むPBS で2回洗浄したのち、さらにFITC標識2次抗体抗マウスIgG (MBL)を4℃、30分間反応させた。さらに2%FCS (Equitech)を含むPBSで2回洗浄を行ったサンプルについて、フローサイトメーター (ALTRA BC社)で解析を行った。

[0081] 結果を図6に示す。#33抗体は、ホルボールエステルで分化させたマクロファージ様細胞THP-1に強く反応することがわかった (図6C)。なお、T Cell系のMolt-4、ヒト臍帯内皮細胞であるHUVEC も、#33抗体に反応性を示した。

[0082] このTHP-1細胞について、#33抗体を用いて免疫沈降実験を行い、抗原候補分子を検出・単離した。対照としてアイソタイプコントロールを用いた。まず、0.5mM NHS-LC-Biotin (Pierce社)を含むPBSを $1.0 \times 10^7$  cells/mlとなるようにTHP-1細胞に添加し、4℃で1時間反応させて、細胞表面タンパク質を標識した。ついで、ビオチン化した細胞をよく洗浄した後、NP-40 (ナカライテスク)、Protease Inhibitorカクテル (シグマ)を含むPBSで表面タンパク質を可溶化した。可溶化されたタンパク質を、Human IgG (シグマ)を吸着させたProteinA (アマシャムファルマシア)と1時間混和し、非特異的に反応するタンパク質を沈降させて除去した。沈降処理後の上清に抗体を添加し、4℃で1時間以上反応させた後、ProteinAセファロース (アマシャムファルマシア)で抗体に結合したタンパク質を沈降させた。ProteinAに吸着したタンパク質を溶出し、SDS-PAGEを実施したのち、Avidine-POD (MBL)、ECL (アマシャムファルマシア)を用いて、標識された目的タンパク質を検出した。また、CBB染色による検出も行った。その結果、分子量100 kDa付近に2本の特異的なバンドを検出した。結果を図7Aに示す。

[0083] 上記SDS-PAGEゲルから上記2本のバンドを切り出し、アプロサイエンス社に依頼して解析を行った。ゲル片の酵素消化 (リジルエンドペプチダーゼ)、それに続くLC-MS/MS解析、Mascot Searchの結果、2本のバンドのうち、上のバンドはCD51 (112kDa)、下のバンドはCD61 (84kDa)であることが判明した。

[0084] #33の抗原候補分子として挙げたCD51とCD61のうち、#33抗体の抗原がどちらであるかを決定するため、フローサイトメリー解析を実施した。PBMCを#33、2次抗体で染色した後、PE標識CD51抗体 (BC社)、またはPE標識CD61抗体 (SZ21、BC社)

を4℃、30分間反応させて二重染色し、フローサイトメトリーを実施した。

[0085] 図7Bに結果を示す。CD51と#33によって二重に染色される細胞集団は検出されず、一方、CD61 (SZ21、BeckmanCoulter社)と#33の染色性が一致した。この結果から、#33の抗原はCD61であると結論した。さらに、図7Bに示されるように、#33とクローンSZ21は互いに染色を阻害しないことから、#33が認識するエピトープとCD61抗体SZ21が認識するエピトープとが異なることが分かる。

[0086] 一方、#33抗体とエピトープが相違するにも関わらず、CD61抗体SZ21にも、PBMCによるIFN $\gamma$ 産生を著しく抑制する活性が認められた(図2A)。このことから、IFN $\gamma$ 産生を抗CD61抗体で抑制するにあたっては、エピトープに関わらず、CD61 (Integrin  $\beta$  III)を介してCD61発現細胞にシグナルをインプットすることが重要であると推測できる。

[0087] (実施例5) CD61発現細胞の検討

CD61発現細胞について、検討した。PBMC中において、CD61は単球に発現していることが知られている(非特許文献7)。PBMC中の#33陽性細胞と#33陰性細胞をセルソーターで分離・回収し、各種サイトカイン産生能を調べた。その結果、#33陽性細胞はIL-10を産生し、IFN $\gamma$ を産生しないことがわかった。また逆に、#33陰性細胞はIL-10を産生せず、IFN $\gamma$ を産生することがわかった(データ示さず)。IFN $\gamma$ が末梢血中のTh1で主に産生されていることを考えると、#33抗体は単球に働きかけてIL-10産生を促し、これによりナイーブT細胞(Th0)からTh1への分化が阻止され、結果的にIFN $\gamma$ 産生量を減少させるという機構が考えられる。

[0088] (実施例6) #33の血小板凝集への影響

CD61が血小板において強く発現していることから、#33が血小板凝集へ与える影響を検討した。血液(凝固剤;クエン酸ナトリウム)を室温にて800rpm, 15min 遠心し、上清であるPRP(Platelet Rich Plasma)を得た。コントロールとして、血液を室温にて2,300rpm, 15min遠心し、上清であるPPP(Platelet Poor Plasma)を取得した。上記PRPにコラーゲン(凝集促進物質)または#33を終濃度0, 5, 10, 20, 30, 50  $\mu$ g/mlにて添加し、血小板凝集計(NBS, HEMA TRACER)を用いて経時的(数分間)に透光度をモニターリングした。血小板が凝集すると透光度が増すため、得られた透光度が

ら凝集の程度を知ることができる。その結果、#33に血小板を凝集させる活性は認められなかった(図8A)。

- [0089] またコラーゲン誘導型血小板凝集に与える#33抗体の影響を調べるため、血小板凝集物質であるコラーゲン(終濃度 $2\mu\text{g/ml}$ )をPRPに添加し、さらに#33抗体を添加し、血小板凝集計で測定した。対照として、#33抗体に代えて血小板凝集阻害機能のあるCD61(MBL CD61)を添加し、同様に測定した。コラーゲンによる凝集への阻害効果について、若干の凝集阻害が確認された(図8B)。これらから、#33に血小板を凝集させる活性はなく、むしろ凝集を阻害する活性を持つことが判明した。

- [0090] (実施例7) 血小板存在下における#33による $\text{IFN}\gamma$ 産生能抑制効果の検討

上述のとおり、CD61が血小板において強く反応することから、血小板存在下でも#33による $\text{IFN}\gamma$ 産生能の抑制効果が示されるかどうかを確認した。PBMCに刺激物質(Poly(I:C))、#33、血小板を含む培養液(PRП)を同時に添加し、産生される $\text{IFN}\gamma$ を測定した。PRPは実施例6と同様に調整し、plasmaを10%FCS入りRPMIに置き換えて使用した。#33は培養液中に終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ で添加した。PRPはPBMC:PRP(体積)が1:1、5:1、10:1となるように培養液中に添加した。添加後48時間後の $\text{IFN}\gamma$ 産生量を測定した結果、血小板が存在していても#33は $\text{IFN}\gamma$ 産生を抑制することが確認できた(図9)。

- [0091] (実施例8)  $\text{F(ab')}_2$ 化#33抗体による炎症性サイトカイン産生抑制効果の検討

#33抗体をそのまま人体に投与すると、#33が血小板に結合し、抗体のFc部がマクロファージの標的となることより派生する二次的作用を無視できないと考えられる。そこで $\text{F(ab')}_2$ 化した抗体を作製し、 $\text{F(ab')}_2$ 化抗体の $\text{IFN}\gamma$ 産生抑制効果を検討した(図10A)。

- [0092] #33のIgGを上述実施例1のとおり精製した後、ペプシン-アガロース(シグマ)にて0.1M 酢酸(pH4.3)、 $37^\circ\text{C}$ 、20時間処理し、 $\text{F(ab')}_2$ 化した。ペプシン分解後、ProteinA(アマシャムファルマシア)でFc部分をもった未消化物を吸着させ、 $\text{F(ab')}_2$ 画分を精製した。精製した $\text{F(ab')}_2$ 化#33について、7.5%アクリルアミドゲルを用いて非還元状態でSDS-PAGEを実施したのち、CBB染色を行い、分子量と精製度を確認した。非還元状況下でSDS-PAGEを実施すると、ペプシン未消化物は約200kDaに、F(

ab')<sub>2</sub>は約150kDaあたりに検出できることから、精製F(ab')<sub>2</sub>の分子量および精製度について、精製物が150kDaに検出できるかどうか、また未消化物(200kDa)が混在していないかどうかを確認した。精製F(ab')<sub>2</sub>化#33抗体について、フローサイトメトリーで反応性を確認した(データ非提示)。

[0093] PBMCにPoly(I:C)を添加すると同時に、精製した#33F(ab')<sub>2</sub>を添加して、48時間後のIFN $\gamma$ 産生量をELISAで測定した。#33F(ab')<sub>2</sub>は、終濃度10 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、0.1 $\mu$ g/mlで添加した。図10Bに結果を示すとおり、F(ab')<sub>2</sub>化した#33にもIFN $\gamma$ 産生抑制活性が確認された。この結果は、末梢血に#33F(ab')<sub>2</sub>を投与してもIFN $\gamma$ 産生抑制の効果が十分期待できることを示している。

[0094] (実施例9)#33抗体の可変領域およびCDRの配列決定

#33を産生するハイブリドーマを総量で1x10<sup>7</sup> cells集めて破碎した後、Fast Track 2.0 kit (Invitrogen)を用いて、総量6.0 $\mu$ gのmRNAを回収・精製した。このmRNAをもとに合成したcDNA (Time Saver, Amersham)を鋳型にしてPCRを行い、抗体の重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子を増幅した。使用したプライマーを下記に示す。

重鎖増幅用フォワードプライマー: ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT (配列番号17)

重鎖増幅用リバースプライマー: CAGTGGATAGACCGATGGGGC (配列番号18)

軽鎖増幅用フォワードプライマー: ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC (配列番号19)

軽鎖増幅用リバースプライマー: ACTGGATGGTGGGAAGATGG (配列番号20)

Ambiguity code: R= A or G, K= G or T, M= A or C, W= A or T

増幅したPCR産物を精製した後(PCR purification kit, QIAGEN)、それぞれpBluescriptIIISK+(STRATAGENE)にクローニングし、シーケンス解析を行った(

SEQ2000, Beckman Coulter)。上記解析によって得られた配列を公知配列(

Sequences of Proteins of Immunological Interest FIFTH EDITION 1991, Elvin A.

Kabat et al, NIH Publication No. 91-3242)と比較して、CDRを決定した。

産業上の利用の可能性

[0095] 本発明によって、新たな炎症性サイトカイン抑制剤が提供された。本発明によって

提供された物質は、炎症性サイトカイン抑制効果を通じて、炎症性疾患や高サイトカイン血症の予防または治療に有用な医薬品として使用できる。



## 請求の範囲

- [1] CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する物質またはその誘導体。
- [2] 物質がタンパク質である、請求項1に記載の物質またはその誘導体。
- [3] 物質が抗体である、請求項1に記載の物質またはその誘導体。
- [4] 炎症性サイトカインがIFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-1、IL-6のいずれかである請求項1、請求項2、または請求項3に記載の物質またはその誘導体。
- [5] IL-10産生誘導効果を有する、請求項1、請求項2、請求項3、または請求項4に記載の物質またはその誘導体。
- [6] 請求項1から請求項5のいずれかに記載の物質またはその誘導体を有効成分とする、炎症性サイトカイン産生抑制剤。
- [7] 下記(a)から(d)に記載の単離されたDNA。
  - (a) 配列番号9から配列番号16のいずれかに記載のDNA
  - (b) 配列番号1から配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするDNA
  - (c) 配列番号9から配列番号16のいずれかに記載のDNAとストリンジेंटな条件でハイブリダイズするDNA
  - (d) 配列番号1から配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入、および／または置換されたアミノ酸配列をコードするDNA
- [8] 請求項7に記載のDNAを保持するベクター。
- [9] 請求項7に記載のDNAまたは請求項8に記載のベクターを保持する形質転換体。
- [10] 重鎖ポリペプチドが下記(a)または(b)のいずれかに記載のポリペプチドである、抗CD61抗体。
  - (a) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド
  - (b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列番号4に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチド
- [11] 下記(a)または(b)のいずれかに記載のアミノ酸配列を、重鎖ポリペプチドのCDR(complementary determining region)のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体。

- (a) 配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列
- (b) 配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号1から配列番号3のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR (complementary determining region) として機能するアミノ酸配列
- [12] 軽鎖ポリペプチドが下記 (a) または (b) のいずれかに記載のポリペプチドである、抗CD61抗体。
- (a) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド
- (b) 配列番号8に記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、配列番号8に記載のアミノ酸配列と機能的に同等であるアミノ酸配列を含むポリペプチド
- [13] 下記 (a) または (b) のいずれかに記載のアミノ酸配列を、軽鎖ポリペプチドのCDR (complementary determining region) のアミノ酸配列として含む、抗CD61抗体。
- (a) 配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列
- (b) 配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または置換されたアミノ酸配列であって、該配列番号5から配列番号7のいずれかに記載のアミノ酸配列と同等にCDR (complementary determining region) として機能するアミノ酸配列
- [14] 請求項6に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤、または、請求項10から請求項13のいずれかに記載の抗CD61抗体を含む、炎症性疾患の予防または治療用医薬品。
- [15] 請求項6に記載の炎症性サイトカイン産生抑制剤、または、請求項10から請求項13のいずれかに記載の抗CD61抗体を含む、高サイトカイン血症の予防または治療用医薬品。
- [16] 請求項1から請求項5のいずれかに記載の物質またはその誘導体、または、請求項10から請求項13のいずれかに記載の抗CD61抗体を用い、炎症性サイトカインの産生を抑制する方法。
- [17] 検体を抗CD61抗体と接触させる工程を含む、炎症性疾患治療または高サイトカイン

血症治療における請求項14または請求項15に記載の医薬品の有効性を判定する方法。

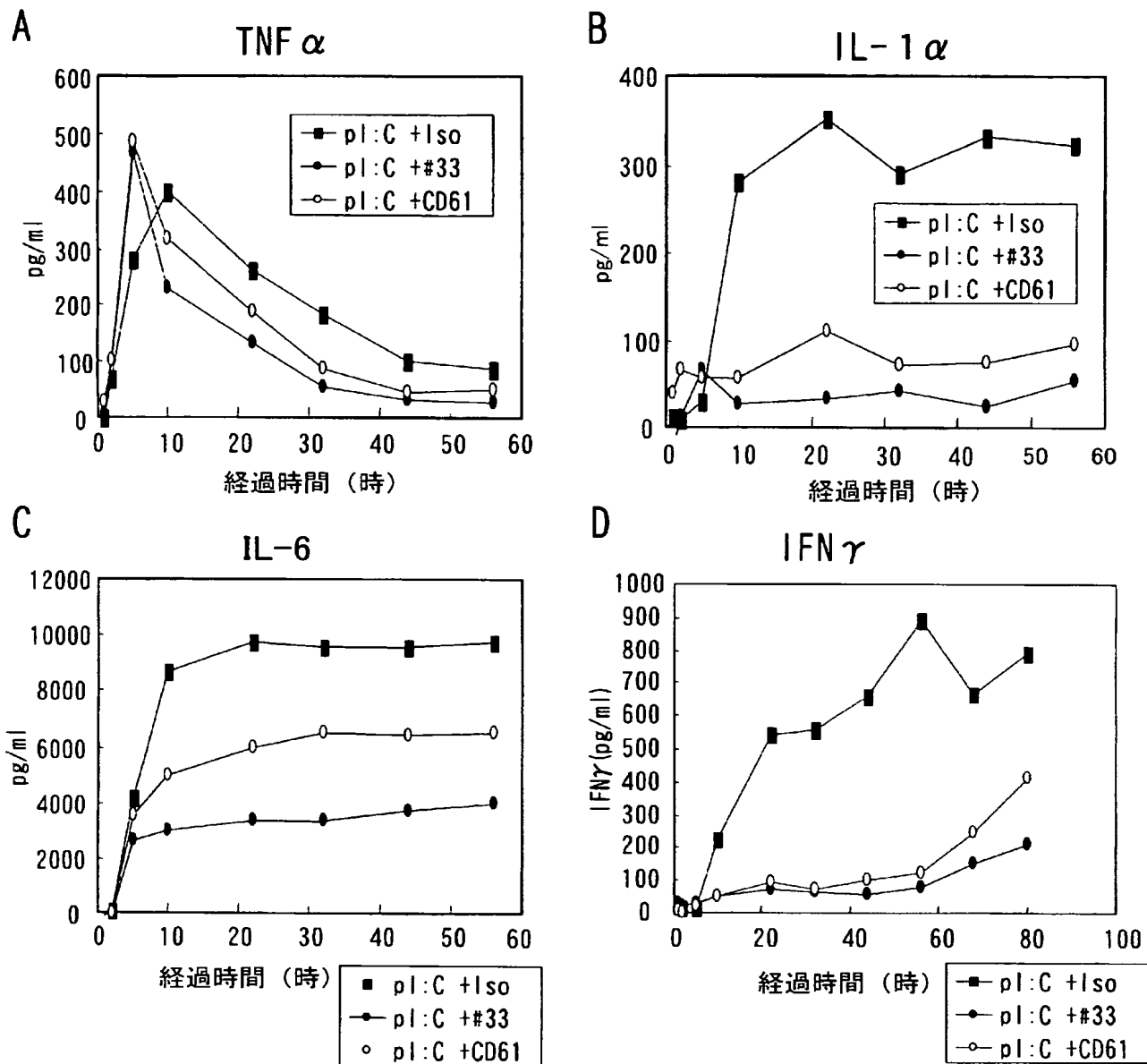
[18] 炎症性疾患治療または高サイトカイン血症治療における請求項14または請求項15に記載の医薬品の有効性を判定するためのキット。

[19] 下記(a)から(b)記載の工程を含む、CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する物質をスクリーニングする方法。

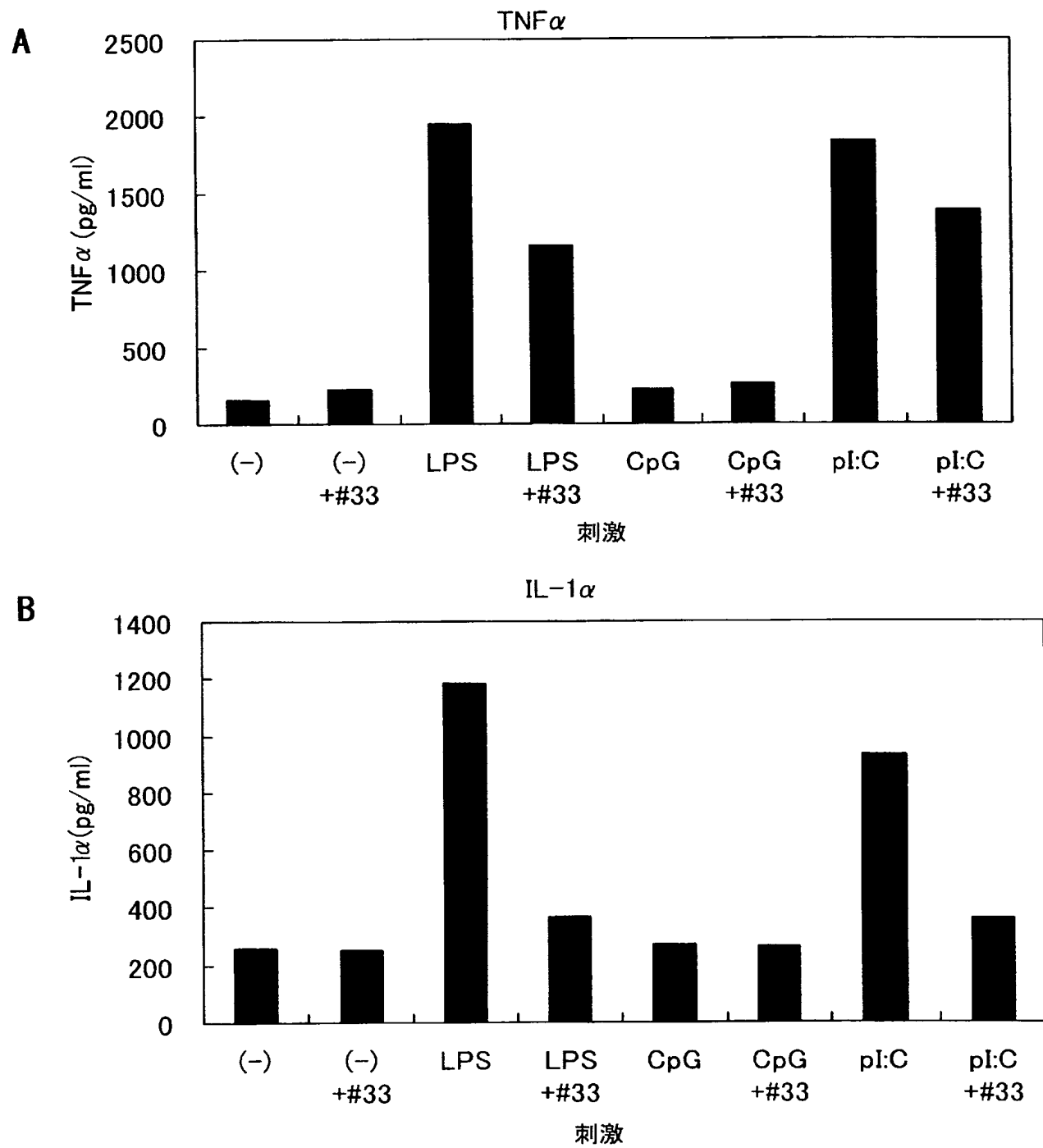
(a) CD61発現細胞にサイトカイン産生誘導剤および被験物質を接触させる工程

(b) 炎症性サイトカインの量を測定し、サイトカイン産生誘導剤のみを接触させた対照と比較して、サイトカイン産生量を低下させた被験物質を選択する工程

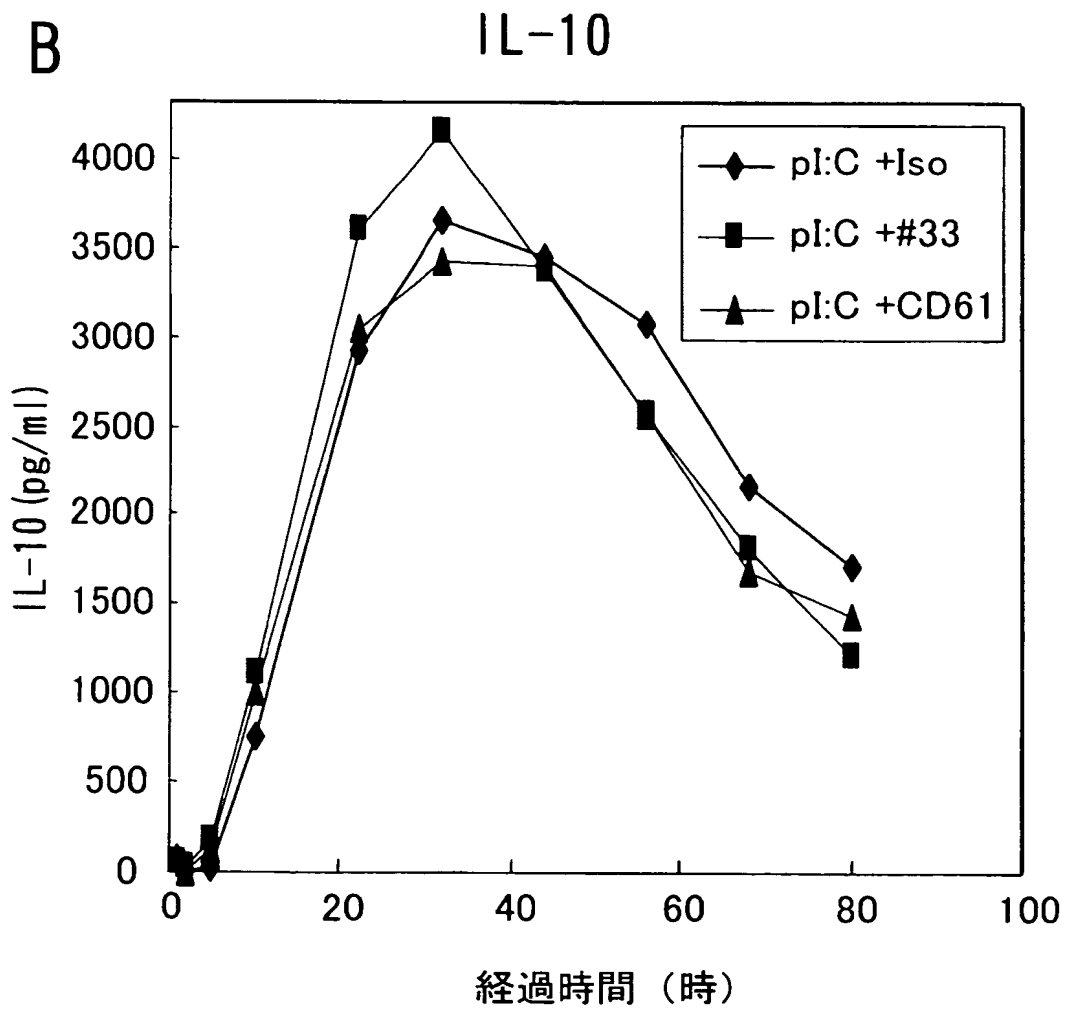
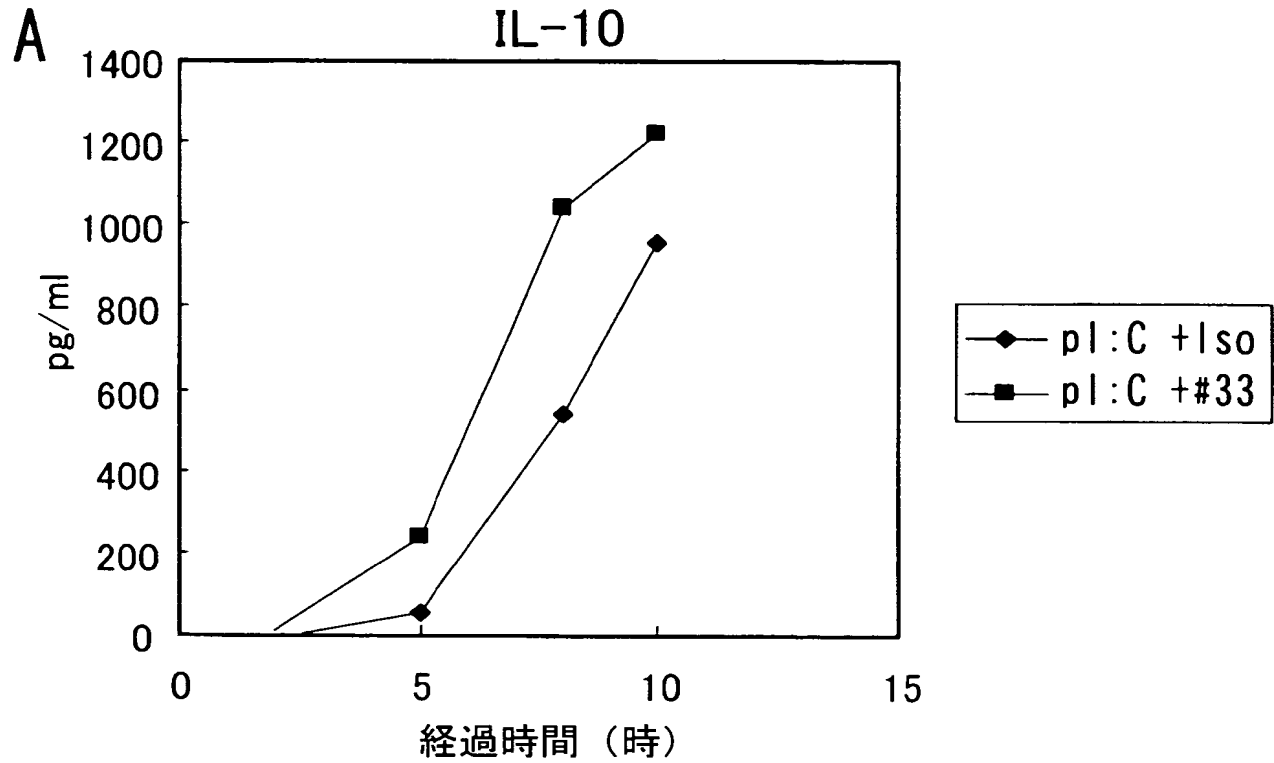
[図1]

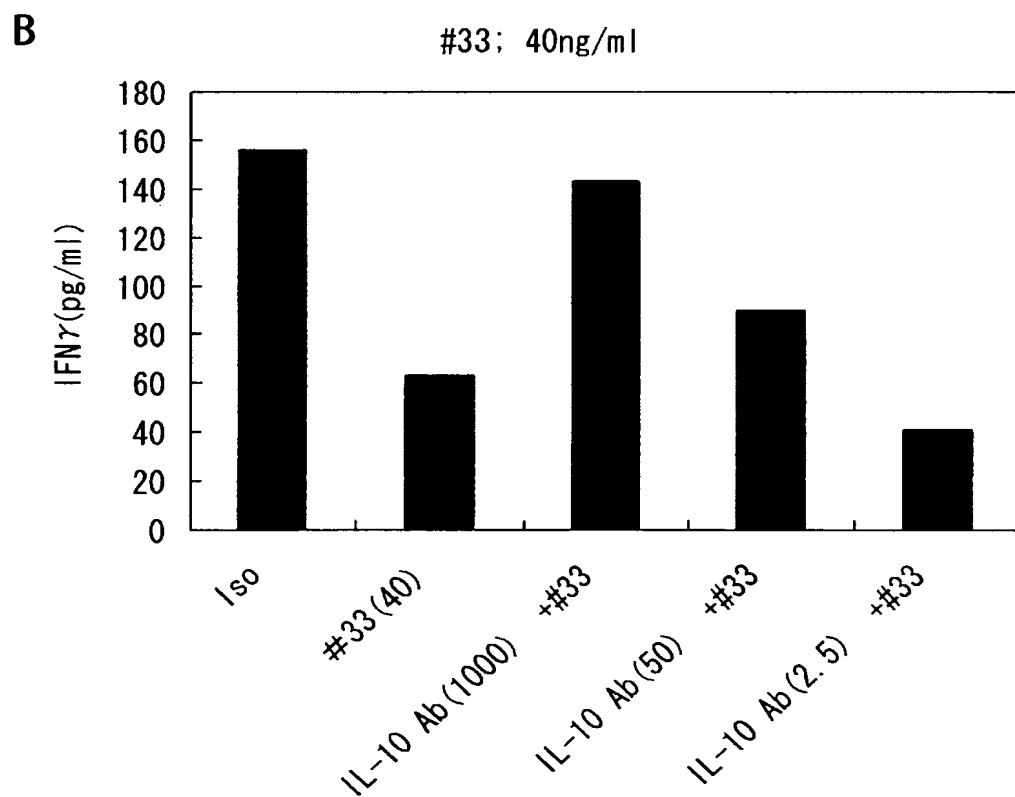
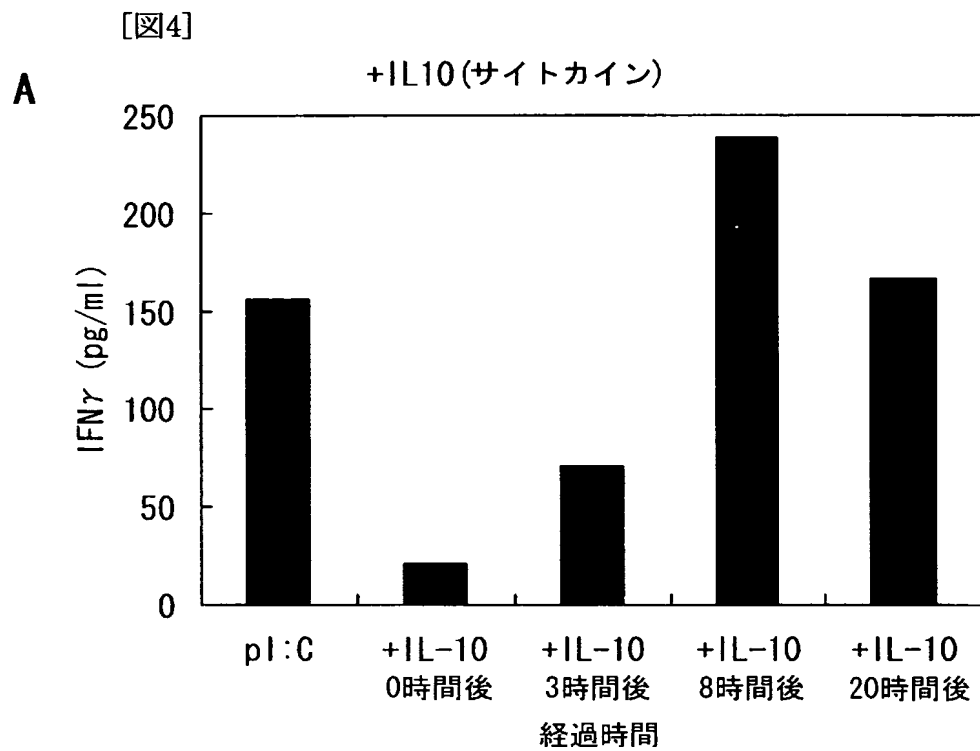


[図2]

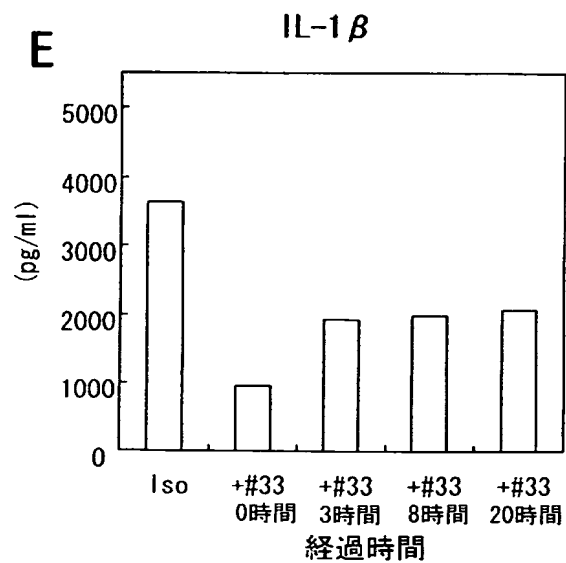
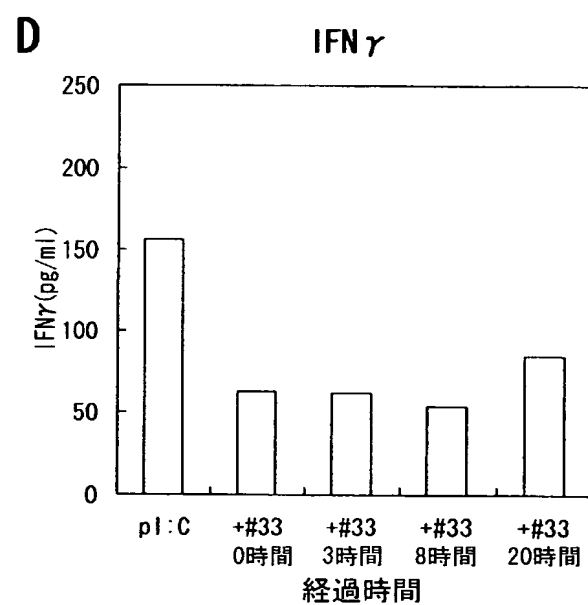
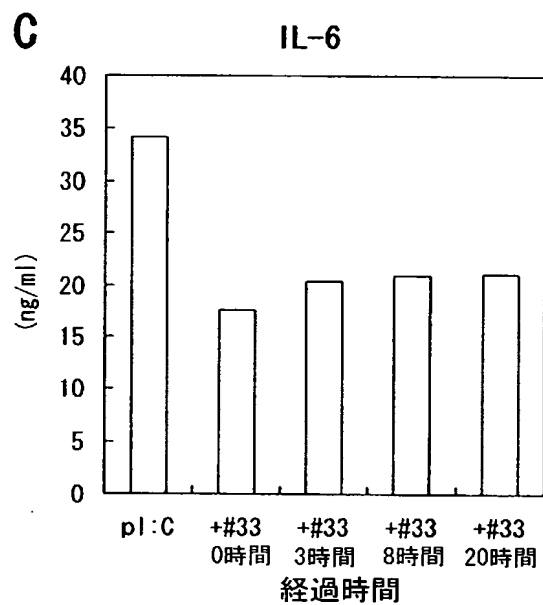
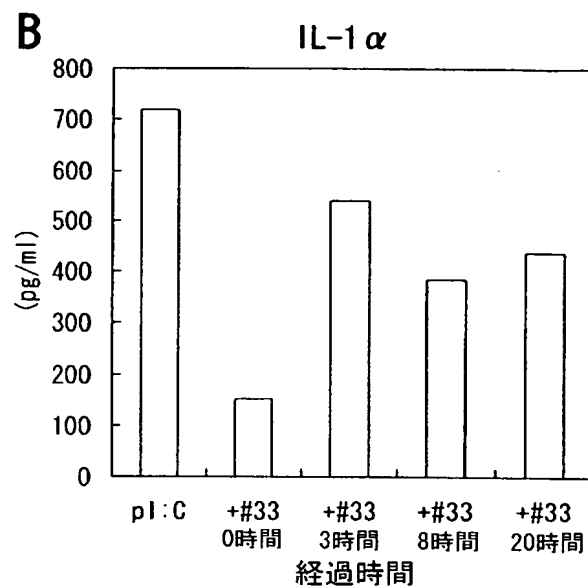
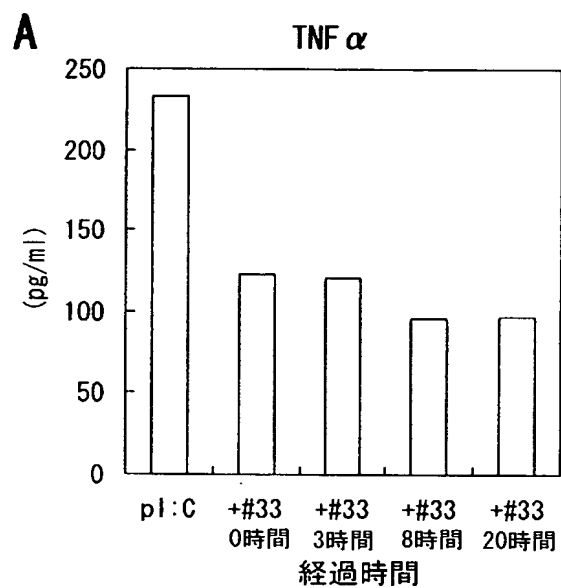


[図3]



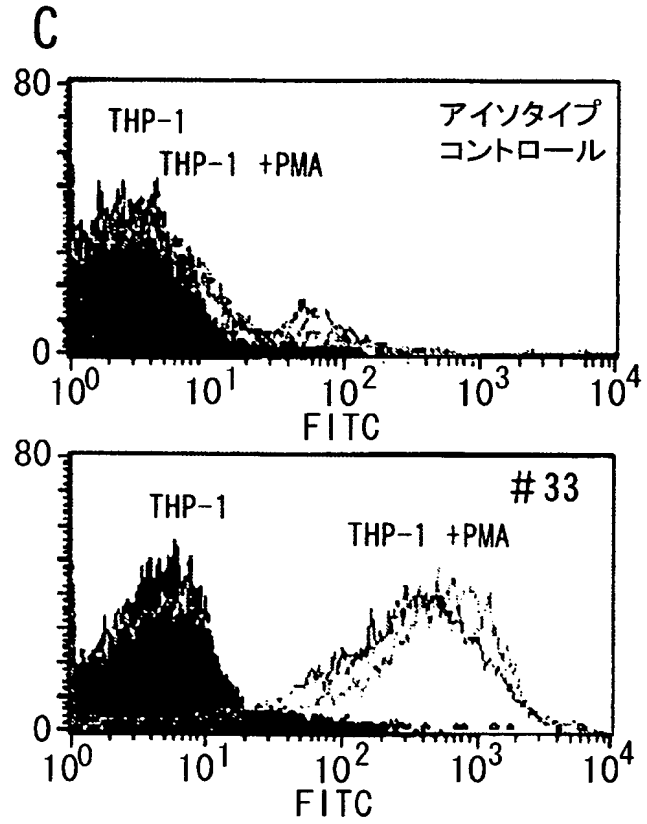
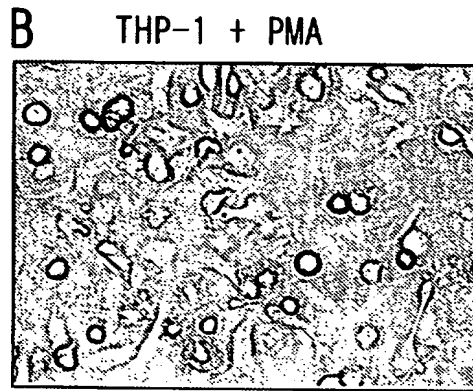
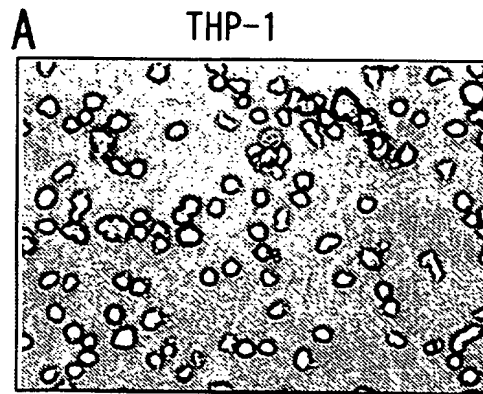


[図5]

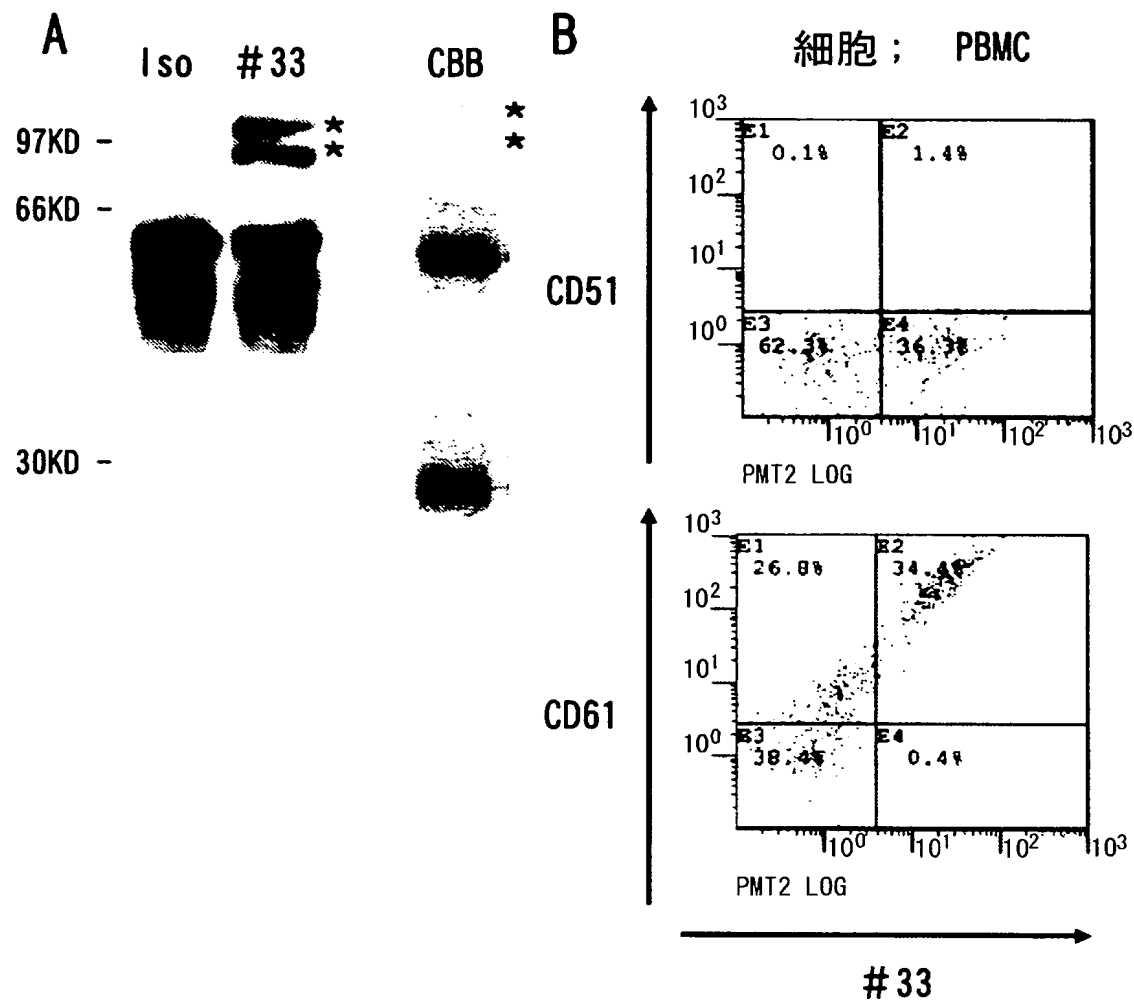




[図6]



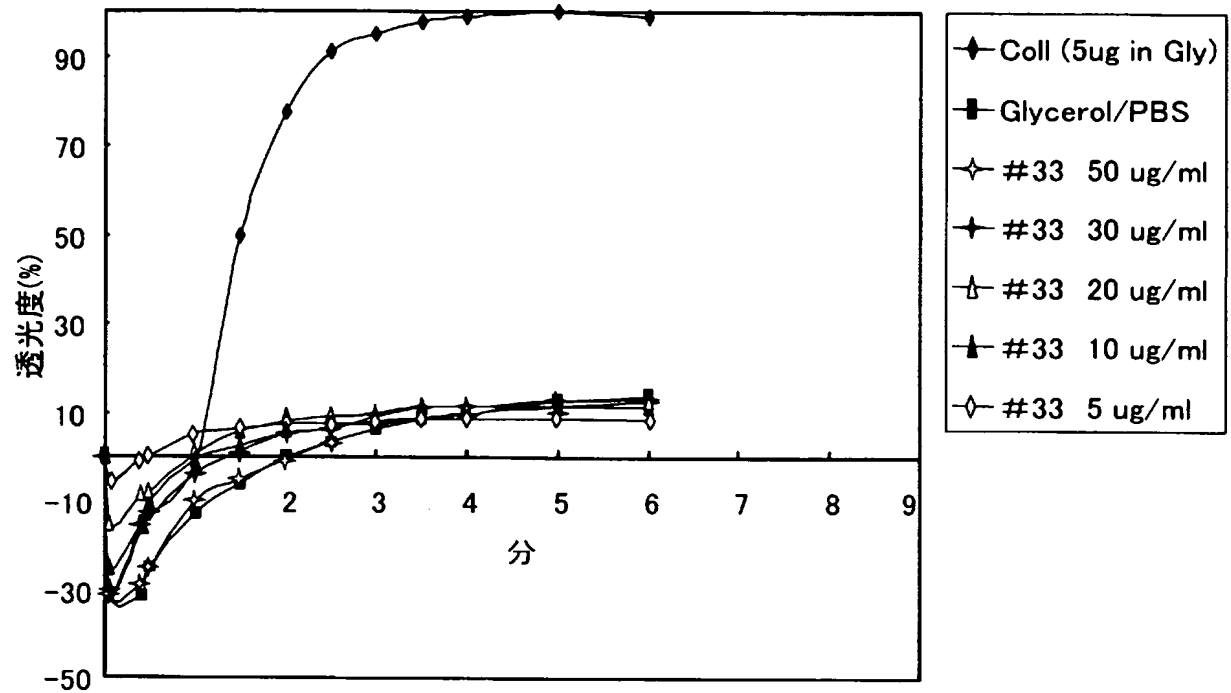
[図7]



[図8]

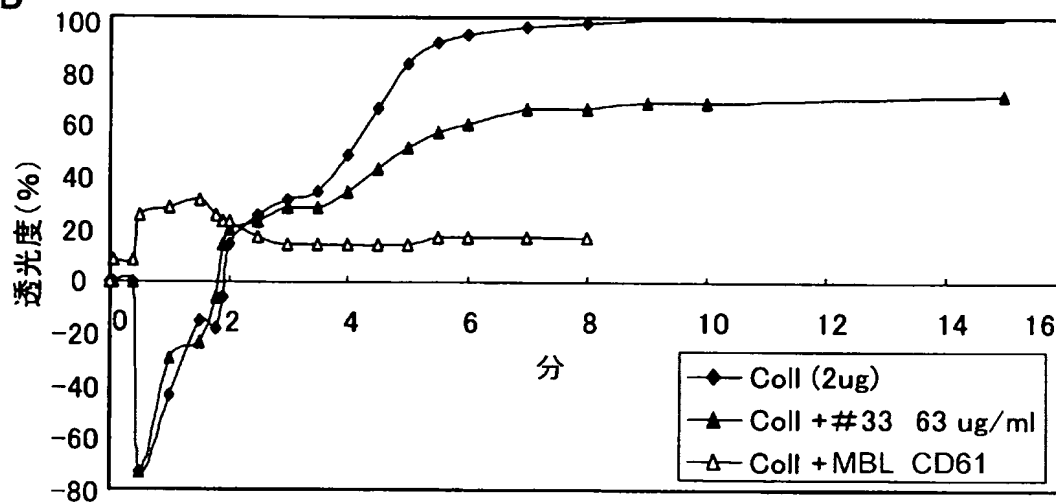
A

## 血小板凝集

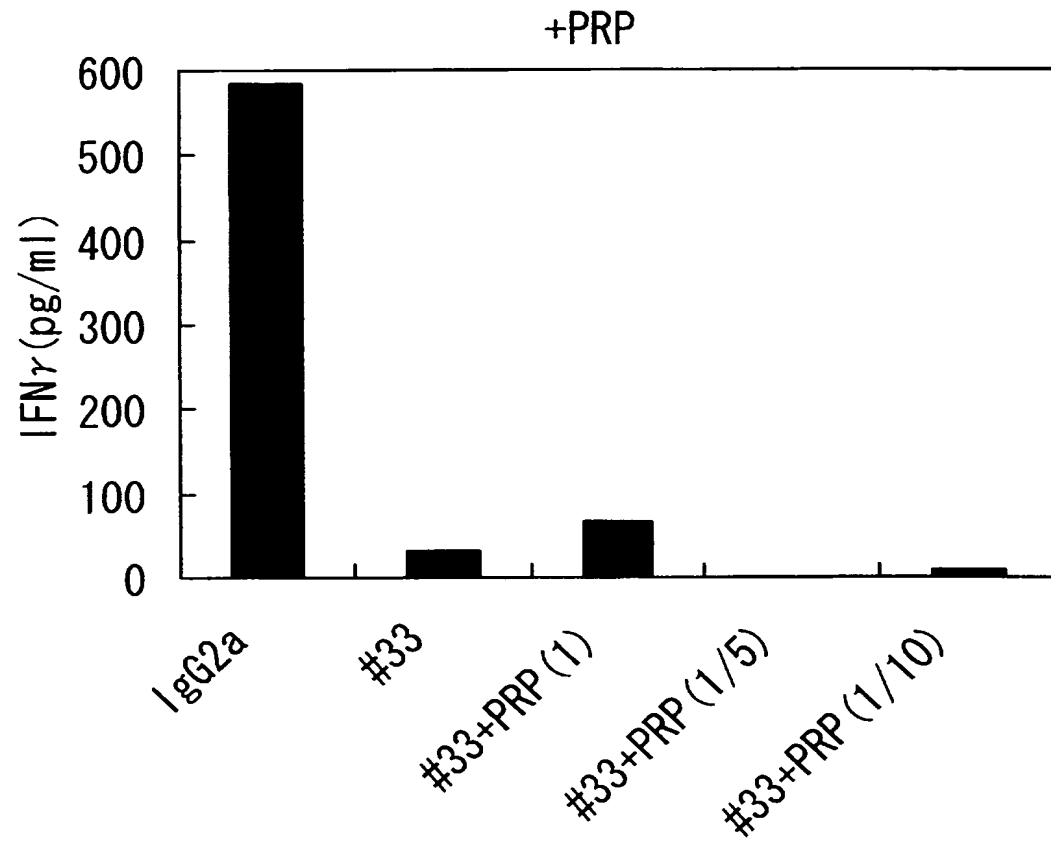


B

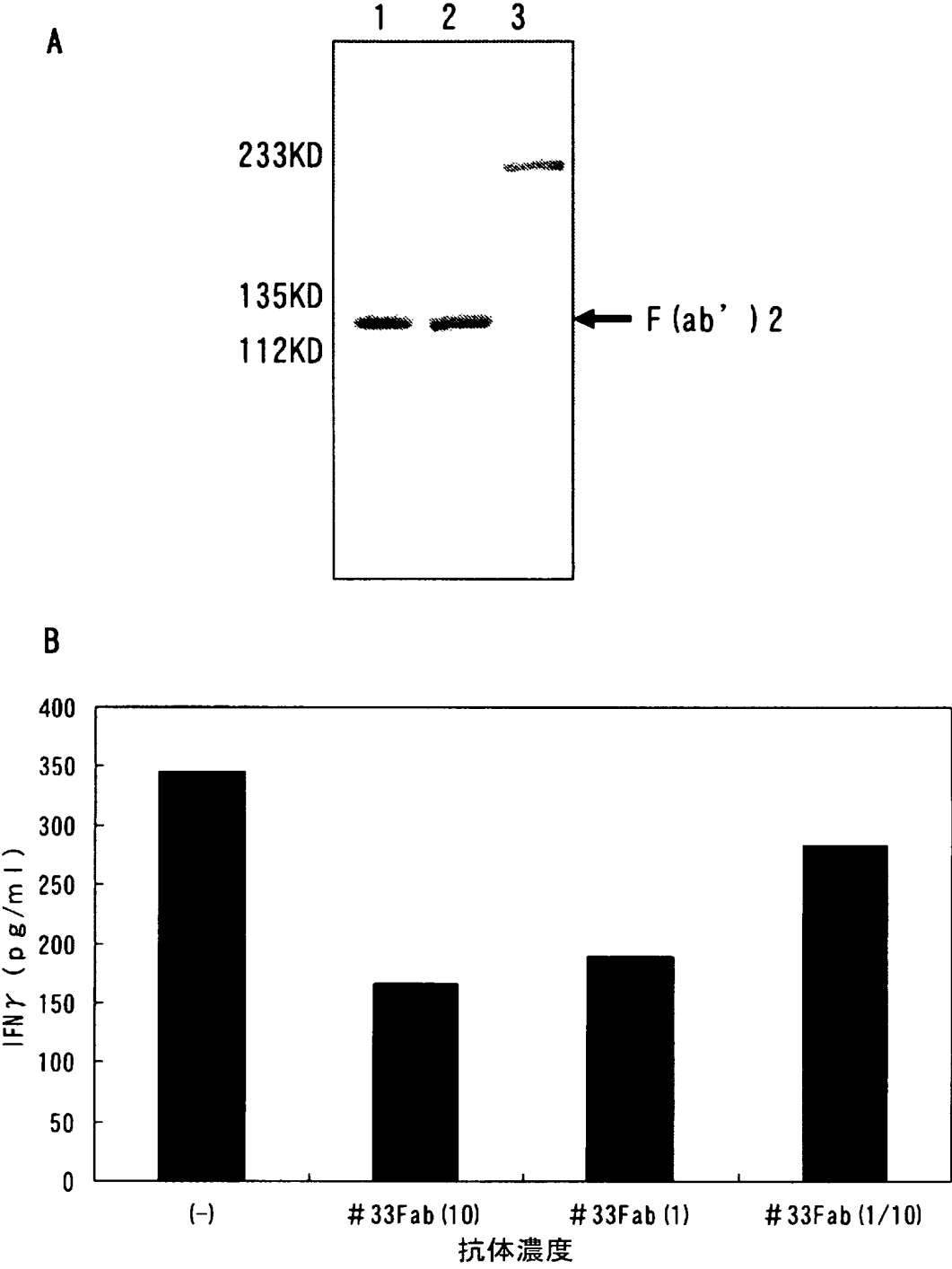
## 血小板凝集阻害



[図9]



[図10]



[図11]

#33重鎖					
10	20	30	40	50	60
ATGGAATGGAGCGGGTCTTTATCTTCCTCCTGTCAGGAACCTACAGGTGTCCACTCTGAG					
M	E	W	S	G	V
F	I	F	L	L	S
G	T	T	G	V	H
S	E				
70	80	90	100	110	120
GTCCAGCTGCTACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCC					
V	Q	L	L	Q	S
G	P	E	L	V	K
P	G	A	S	M	K
I	S				
130	140	150	CDR1	160	170
180					
TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCAT					
C	K	A	S	G	Y
S	F	T	G	Y	T
M	N	W	V	K	Q
S	H				
190	200	210	CDR2	220	230
240					
GGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAGTGGTGTACTACCTACAAC					
G	K	N	L	E	W
I	G	L	I	N	P
Y	S	G	V	T	T
Y	N				
250	260	270	280	290	300
CAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAGTCTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG					
Q	R	F	K	G	K
A	T	L	T	V	D
K	S	S	S	T	A
Y	M				
310	320	330	340	350	360
GAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAACGGGGGGGCT					
E	L	L	S	L	T
S	E	D	S	A	V
Y	Y	C	A	T	R
G	A				
370	CDR3	380	390	400	410
420					
CTGGGACAGGCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA					
L	G	Q	A	Y	Y
F	D	Y	W	G	Q
G	T	T	L	T	V
S	S				
430	440	450			
GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTG (配列番号 : 1 2)					
A	K	T	T	A	P
S	V	Y	P	L	(配列番号 : 4)

[図12]

#33 軽鎖					
10	20	30	40	50	60
ATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATGATTTCC					
M	D	L	Q	V	Q
I	I	S	F	L	L
I	S	A	S	V	M
I	S				
70	80	90	100	110	120
AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTTATCATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAGG					
R	G	Q	I	V	L
T	Q	S	P	V	I
M	S	A	S	P	G
E	R				
130	140	CDR1	150	160	170
180					
GTCACCTTGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAG					
V	T	L	T	C	S
A	S	S	S	V	N
Y	M	H	W	Y	Q
Q	K				
190	200	210	CDR2	220	230
240					
TCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCT					
S	G	T	S	P	K
R	W	I	Y	D	T
S	K	L	A	S	G
V	P				
250	260	270	280	290	300
CCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTTcGGGACATCATACTCTCTCACAATCACCAACATGGAG					
P	R	F	S	G	S
G	F	G	T	S	Y
S	L	T	I	T	N
M	E				
310	320	330	CDR3	340	350
360					
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAAGCCACCCACGTTTCGGT					
A	E	D	A	A	T
Y	Y	C	Q	Q	W
S	S	K	P	P	T
F	G				
370	380	390	400	410	420
TTTGGGACCAAGCTGGAGCTGCAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCA					
F	G	T	K	L	E
L	Q	R	A	D	A
A	P	T	V	S	I
F	P				
430					
CCATCCAGT (配列番号:16)					
P S S (配列番号:8)					

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000567

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N15/09, C12Q1/02, A61K45/00, 37/02, 39/395,  
A61P29/00, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/00-46, C12N15/00-90, C12Q1/00-70, A61K45/00, 37/02,  
39/395, A61P29/00, G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. Stumpf et al., Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure, 2003, Eur.J.Heart Fail, 5(5), p.629-37	1-5
A	S. Weng et al., $\beta$ 3 integrin deficiency promotes atherosclerosis and pulmonary inflammation in high-fat-fed, hyperlipidemic mice, 2003, Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 100(11), p.6730-5	1-19
A	C.S. Elangbam et al., Cell adhesion molecules—update, Veterinary Pathology, 1997, 34(1), pages 61 to 73	1-19
A	F.N. Lauw et al., Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia, 2000, The Journal of Immunology, 165, p.2783-9.	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 March, 2005 (10.03.05)

Date of mailing of the international search report  
29 March, 2005 (29.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000567

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-514059 A1 (COR THERAPEUTICS INC.), 14 May, 2002 (14.05.02), & WO 1998/022583 A1 & EP 0939815 A1 & US 6194557 B1	1-19
A	WO 2002/012501 A2 (CENTOCOR INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), & EP 1309693 A2 & JP 2004-510414 A1 & US 2004/0185507 A1	1-19
A	WO 2000/078815 A1 (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION), 28 December, 2000 (28.12.00), & EP 1189946 A1 & JP 2004-537957 A1 & US 2003/0166872 A1	1-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/000567

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-7, 10-13 part of 16  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1 to 6 and 16

It is unknown that what specific substance "a substance or its derivative" according to claims 1 to 6 means. Thus, it appears that these claims are not clearly described.

Among "a substance or its derivative" as described above, nothing but the antibody #33, an anti-CD61 antibody and a fragmented (F(ab'2)) antibody #33 is indicated in practice as "being capable of binding to CD61 protein and having an effect of inhibiting the production of inflammatory cytokines" in EXAMPLES, etc. Namely, it is unknown what substances other than them correspond thereto. Moreover, an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to confirm "being capable of binding to CD61 protein and having an effect of inhibiting the production of inflammatory cytokines" in practice. Therefore, the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 1 to 6 and 16

It is unknown that a substance of what specific structure "a derivative" according to the above claims means. Thus, it appears that these claims are not clearly described.

Although EXAMPLES and so on are examined concerning "a derivative" as described above, it is unknown what substances "are capable of binding to CD61 protein and have an effect of inhibiting the production of inflammatory cytokines". An excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such a substance. Therefore, the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 7 and 10 to 13

Concerning an anti-CD61 antibody encoded by "a DNA hybridizable under stringent conditions" and "a DNA encoding an amino acid sequence having deletion, addition, insertion and/or substitution of one or more amino acids" according to claim 7 and an anti-CD61 antibody having, as a heavy chain or a light chain, a polypeptide containing "an amino acid sequence having deletion, addition, insertion and/or substitution of one or more amino acids" according to claims 10 to 13, there is a low possibility that such a mutated anti-CD61 antibody has the same activity as the original antibody. Therefore, it is unknown a DNA or a polypeptide having what specific structure corresponds to the DNA or polypeptide according to the above claims. An excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such a DNA or polypeptide. Therefore, the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

(Continued to the next sheet.)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000567

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/28, C12N 15/09, C12Q 1/02, A61K 45/00, 38/00, 39/395, A61P 29/00, G01N 33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/00-46, C12N 15/00-90, C12Q 1/00-70, A61K 45/00, 38/00, 39/395, A61P 29/00, G01N 33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	C. Stumpf, et. al, Enhanced levels of CD154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure, 2003, Eur J Heart Fail, 5(5), p. 629-37	1-5
A	S. Weng, et. al, $\beta$ 3 integrin deficiency promotes atherosclerosis and pulmonary inflammation in high-fat-fed, hyperlipidemic mice, 2003, Proc Natl Acad Sci U S A, 100(11), p. 6730-5	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 03. 2005

国際調査報告の発送日

29. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	C. S. Elangbam, et. al, Cell adhesion molecules—update, Veterinary Pathology, 1997, 34(1), p. 61-73	1-19
A	F. N. Lauw, et. al, Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia, 2000, The Journal of Immunology, 165, p. 2783-9.	1-19
A	JP 2002-514059 A1 (COR THERAPEUTICS INC) 2002.05.14 & WO 1998/022583 A1 & EP 0939815 A1 & US 6194557 B1	1-19
A	WO 2002/012501 A2 (CENTOCOR INC) 2002.02.14 & EP 1309693 A2 & JP 2004-510414 A1 & US 2004/0185507 A1	1-19
A	WO 2000/078815 A1 (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION) 2000.12.28 & EP 1189946 A1 & JP 2004-537957 A1 & US 2003/0166872 A1	1-19

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-7, 10-13, 16の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 請求の範囲 1-6、16

請求の範囲 1-6に係る「物質またはその誘導体」は、具体的にどのような物質であるか不明である。したがって、該請求の範囲は明確に記載されているとはいえない。

また、該「物質またはその誘導体」について、実施例等で「CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する」ことが実際に示されている物質は、#33抗体、抗CD61抗体及びF(ab')<sub>2</sub>化#33抗体のみであり、これらの物質以外に、どのような物質が該当するか不明であり、また、実際に「CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する」ことを確認することは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 1-6、16

上記請求の範囲に係る「誘導体」は、具体的にどのような構造を有する物質であるか不明である。したがって、該請求の範囲は明確に記載されているとはいえない。

また、該「誘導体」について、実施例等を見ても、どのような物質が「CD61タンパク質結合能を有し、炎症性サイトカイン産生抑制作用を有する」か不明であり、このような物質を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 7、10-13

請求の範囲 7における「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA」及び「1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入及び／または置換されたアミノ酸配列をコードするDNA」がコードする抗CD61抗体、並びに、請求の範囲 10-13における「1または複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入及び／または置換されたアミノ酸配列」を含むポリペプチドを重鎖または軽鎖とする抗CD61抗体について、このように変異した抗CD61抗体が、元の抗体と同等の活性を有する蓋然性は低い。それゆえ、具体的にどのような構造を有したDNAまたはポリペプチドが上記請求の範囲に係るDNAまたはポリペプチドであるか不明であるし、このようなDNAまたはポリペプチドを得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されているとはいえず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。